

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Dermatología



ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO CONSIDERADOS ENTRE LOS CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO

Tesis doctoral presentada por: **D^a Verónica Rodríguez García**


Director de la Tesis Doctoral: **Prof. Dr. Antonio Fernández Nebro**

Málaga, 2017



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Verónica Rodríguez García

 <http://orcid.org/0000-0002-2330-1688>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



FACULTAD DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y DERMATOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Don ANTONIO FERNÁNDEZ NEBRO, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

CERTIFICA

Que D^a VERÓNICA RODRÍGUEZ GARCÍA, ha obtenido y estudiado bajo mi dirección el material necesario para la realización de su tesis doctoral titulada: “Estudio de la prevalencia de anticuerpos antifosfolípidos no considerados entre los criterios diagnósticos del Síndrome Antifosfolípido”. Una vez finalizada autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes expide el presente en Málaga, Enero 2017.

Fdo: Dr. Antonio Fernández-Nebro

Esta tesis ha sido publicada en la revista (artículo completo en Anexo 4):

Rheumatology 2015;54:2042-2050.

Dedicada a mi familia

INDICE GENERAL

I.	RESUMEN	13
II.	INTRODUCCIÓN	17
	1. CONCEPTO	17
	2. ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA	18
	3. CLÍNICA	21
	3.1 SAF catrastrófico	
	3.2 Redefinición de SAF	
	4. DIAGNÓSTICO	24
	4.1 Anticuerpos antifosfolípidos incluidos en los criterios de Sydney	
	4.1.1 Anticuerpos anticardiolipinas IgM e IgG	
	4.1.2 Anticuerpos anti β 2-glucoproteína I IgM e IgG	
	4.1.3 Anticoagulante lúpico	
	4.2 Anticuerpos antifosfolípidos no incluidos en los criterios de Sydney	
	4.2.1 Anticuerpos anti-fosfatidietanolamina	
	4.2.2 Fosfolípidos aniónicos distintos de anticuerpos anticardiolipinas (anti-ácido fosfatídico, anti-fosfatidilserina y anti-fosfatidilinositol)	
	4.2.3 Anticuerpos anti-complejo vimentina/cardiolipina	
	4.2.4 Anticuerpos antiprotrombina	
	4.2.5 Resistencia a la actividad anticoagulante de la Anexina A5	
	4.2.6 Anticuerpos IgA anticardiolipinas	
	4.2.7 Anticuerpos IgA anti β 2-GPI	
	5. TRATAMIENTO	35
III.	JUSTIFICACIÓN	45
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
	1. HIPÓTESIS	49
	2. OBJETIVOS	49
	2.1 Objetivo General	
	2.2 Objetivos secundarios	
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	53
	1. DISEÑO	53
	2. FUENTES DE INFORMACIÓN	53
	3. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE DATOS	53
	4. DURACIÓN DEL SEGUIMIENTO	54
	5. SUJETOS	54
	5.1 Población diana	
	5.2 Población accesible	
	5.3 Criterios de inclusión	
	5.4 Criterios de Exclusión	
	6. PROTOCOLO DE ESTUDIO	54
	7. INTERVENCIÓN	55
	8. MEDICIONES Y VARIABLES	55
	8.1 Variables Principales	
	8.2 Variables Secundarias	
	9. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LOS SESGOS DE LOS ESTUDIOS	55
	10. ANÁLISIS ADICIONAL	56

VI.	RESULTADOS	59
1.	SELECCIÓN DE ESTUDIOS	59
2.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	60
3.	MEDIDA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY	61
	3.1 IgA anti- β 2-glucopeína I	
	3.2 Anticuerpos contra el DI de la β 2-glucopeína I	
	3.3 Resistencia a la Anexina A5	
	3.4 Anexina A5	
	3.5 IgA anticardiolipinas	
	3.6 Anticuerpos anti-fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina	
	3.7 Anticuerpos anti-protrombina	
	3.8 Anticuerpos anti-complejo vimentina/cardiopina	
4.	MEDIDA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY	65
5.	PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY	67
6.	PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY	69
7.	RELACIÓN ENTRE EVENTOS TROMBÓTICOS Y LOS ANTICUERPOS NO INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE SYDNEY	70
VII.	DISCUSIÓN	73
	1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	
VIII.	CONCLUSIONES	79
IX.	ABREVIATURAS	83
X.	AGRADECIMIENTOS	89
XI.	BIBLIOGRAFÍA	93
XII.	APÉNDICES	115
	1. APÉNDICE 1	
	<i>Estrategia de búsqueda en Pudmed/Embase</i>	
	2. APÉNDICE 2	
	<i>Hoja de extracción de datos</i>	
	3. APÉNDICE 3	
	<i>Artículo original</i>	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de Sydney (2006).

Tabla 2. Número de pacientes incluidos en cada grupo del estudio.

Tabla 3. Medida de los Ac aPL no incluidos en los criterios diagnósticos de SAF.

Tabla 4. Medida de los Ac aPL incluidos en los criterios diagnósticos de SAF.

Tabla 5. Prevalencia de los Ac aPL no incluidos en los criterios diagnósticos de SAF.

Tabla 6. Prevalencia de los Ac aPL incluidos en los criterios diagnósticos de SAF.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatología del SAF.

Figura 2. Microangiopatía trombótica en biopsia renal de paciente con SAF.

Figura 3. Activación de las plaquetas mediadas por Ac anti β 2-GPI.

Figura 4. Diagrama de flujo de la estrategia de selección de artículos.

RESUMEN

I. RESUMEN

Objetivos: El interés de los ensayos clínicos se ha centrado en conocer los anticuerpos no incluidos actualmente en los criterios de clasificación del Síndrome Antifosfolípido (SAF), para la detección de anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos (PL), proteínas de unión a PL, factores de coagulación y un test para la resistencia de la actividad anticoagulante de la Anexina A5 (AnxA5 R). Por lo tanto, se realizó una revisión sistemática para tratar de establecer la prevalencia de cada uno de estos anticuerpos en pacientes con SAF y en controles (sanos y enfermos).

Material y Métodos:

Diseño: Se realizaron búsquedas en PubMed y Embase utilizando las palabras clave: Antiphospholipid Syndrome (SAF), antiphospholipid antibodies (aPL), non criteria antibodies, new assays, anticardiolipin antibodies (aCL), lupus anticoagulant (AL), anti-Domain I (aDI), IgA anti β 2-glycoprotein I (IgA anti β 2-GPI), anti-phosphatidylserine (aPS), anti-phosphatidylethanolamine (aPE), anti-phosphatidic acid (aPA), anti-phosphatidylinositol (aPI), anti-prothrombin (aPT), anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT), anti-vimentin/cardiolipin complex (aVm/CL) y annexin A5 resistance (AnxA5 R). Se establecieron límites para el lenguaje (inglés), tipo de estudio (ensayos clínicos) y únicamente en humanos. Cada publicación fue sistemáticamente examinada.

Pacientes: se seleccionaron 16 estudios (14 transversales, uno de ellos multicéntrico y 2 casos y controles) de los que se extrajeron datos originales sobre la prevalencia de los anticuerpos antifosfolípido no incluidos en los criterios de clasificación en 1.404 pacientes con SAF, 1.839 controles enfermos y 797 sanos.

Protocolo y descripción de variables: se revisaron todos los artículos por dos de los autores y las dudas surgidas fueron resueltas tras la discusión de varios autores acogiéndose al método de la declaración PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses). Las variables recogidas de forma sistemática fueron las siguientes: prevalencia de IgG aDI, prevalencia de anticuerpos aPE, aPS, IgA aCL, IgA anti β 2-GPI, aPT, AnxA5 R, aPA, aPS/PT, aPI y aVm/CL en pacientes con SAF primario y secundario y controles (sanos y enfermos).

Resultados:

La prevalencia más alta de anticuerpos antifosfolípidos Ac aPL en el grupo mayor de pacientes con SAF fue para IgA anti β 2-GPI (129/229, 56.3%), AnxA5 R (87/163, 53.3%) e IgG aDI (241/548, 43.9%). De todas formas, todos los Ac aPL estudiados no incluidos en los criterios diagnósticos, fueron significativamente más elevados en pacientes con SAF, en comparación con controles sanos y enfermos.

La mayoría de los estudios fueron de tamaños muestrales pequeños y solo seis de estos anticuerpos fueron estudiados en cohortes de más de 100 pacientes: aDI, n=548; aPE, n=337; IgA aCL, n=229; IgA anti β 2-GPI, n=229; aPT, n=207 y la AnxA5 R, n=163. El resto de análisis se realizaron en pequeñas cohortes ($n \leq 100$): aPA, n=76; aPI, n=67; aPS, n=67; aPS/PT, n=44 y aVm/CL, n=40. En general, la prevalencia más alta de estos anticuerpos fue para: IgG (37/40, 92.5%) e IgM (32/40, 80.0%) aVm/CL en un estudio en un solo centro; IgG aPA (46/67, 68.6%) en dos estudios de cinco centros diferentes; IgG aPS (40/67, 59.7%) también en dos estudios de cinco centros diferentes; e IgG aPS/PT (19/44, 43.2%). El pequeño tamaño de las muestras y el número de centros involucrados en estos estudios, hace que la alta prevalencia encontrada de estos anticuerpos sea menos certera.

Conclusiones:

Los estudios para detectar IgA anti β 2-GPI, AnxA5 R e IgG aDI son de particular interés porque han demostrado un potencial importante en la patogénesis del SAF. Sin embargo, se necesitan más estudios, especialmente prospectivos, para confirmar estos hallazgos.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO

El síndrome antifosfolípido (SAF) fue descrito por primera vez en 1963 por Bowie et al (1) en un grupo de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) que desarrollaron trombosis. Dos décadas después fue Hughes (2) quien lo definió como Síndrome anticardiolipinas al ver la asociación de las trombosis con estos anticuerpos (Ac). Posteriormente se supo que estos anticuerpos, también reaccionaban con otros fosfolípidos (PL) unidos a proteínas diferentes a la cardiolipina y que existían otros muchos anticuerpos antifosfolípidos (Ac aPL) distintos a los anticuerpos anticardiolipinas (aCL), relacionados con este trastorno.

El SAF es una enfermedad autoinmune caracterizada por trombosis recurrentes (arteriales, venosas o de la microcirculación) y morbilidad gestacional, junto con positividad de Ac aPL (3).

Es una enfermedad poco frecuente. Menos del 1% de los pacientes con trombosis, presentan aPL, aunque se asocia a una alta morbilidad, debido a las complicaciones de las trombosis recurrentes (4). Podemos encontrar Ac aPL a títulos bajos en el 2-7% de los individuos sanos que donan sangre, mientras que se encuentran a títulos moderados o altos en el 0.2% de la población. La positividad de los Ac aPL aumenta con la edad. El 60-80% de los pacientes con SAF pertenecen al género femenino. El SAF es frecuente dentro de una misma familia, aunque no se conoce un perfil único de HLA (Antígeno Leucocitario Humano). El isotipo IgA es el que aparece con más frecuencia en la población africana (5). En algunos estudios realizados se observó que un 10% de los pacientes con un primer episodio de accidente cerebrovascular (ACV) presentaban Ac aPL positivos (6). De igual forma ocurre hasta con el 21% de mujeres que han sufrido más de tres abortos consecutivos (7). Por otro lado, los polimorfismos de la β 2-glucoproteína I (β 2-GPI) parecen tener una leve relación con el desarrollo de SAF y las personas que carecen de este anticuerpo parecen ser normales (8).

El SAF puede dividirse en primario (como entidad única) y secundario (asociado a otras enfermedades autoinmunes, principalmente a LES o cuadros tipo lupus. El resto de asociaciones menos frecuentes suelen darse con síndrome de Sjögren primario, artritis

reumatoide (AR), esclerodermia, vasculitis y dermatomiositis) (9). No se han encontrado diferencias significativas entre las manifestaciones clínicas o serológicas del SAF primario y secundario (10). Dada su frecuente asociación, es conveniente descartar otros procesos autoinmunes una vez que el paciente haya sido diagnosticado de SAF (11). Igualmente, en pacientes diagnosticados de LES, siempre tendrá que estar presente la posibilidad de que se desarrolle un SAF. Los Ac aPL son muy frecuentes en pacientes con LES (12). Aún no está bien definido el espectro de asociaciones entre SAF y LES, aunque la mayoría de los problemas relacionados con éste último han sido identificados. En asociación con el SAF se han visto anomalías en el encéfalo (13) mielitis transversa, neuropatía óptica, epilepsia (14), complicaciones pulmonares masivas y abortos (15). No se conoce en qué grado, la agregación plaquetaria, las prostaglandinas, el plasminógeno y la fibrinólisis contribuyen a estos fenómenos trombóticos en el LES (16).

2. ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA

Se trata de una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, resultado de interacción de factores ambientales, hormonales y genéticos.

La fisiopatología del SAF es diferente a la de otras enfermedades que causan hipercoagulabilidad. Puede desencadenarse mediante Ac aPL que interfieren con la hemostasia (proteínas C, S y fibrinólisis) y mediante la activación de células que expresan sustancias anticoagulantes. No existe especificidad por un territorio vascular concreto para la producción de trombosis ya que puede darse ésta en la red venosa, arterial o microcirculación capilar (17).

El proceso comienza con la activación y apoptosis de las plaquetas y las células endoteliales o trofoblastos. Mientras tanto los PL migran a la membrana celular externa. Después la β 2-GPI se une a la fosfatidilserina y los Ac aPL se unen a un dímero de β 2-GPI. Todo esto inicia una serie de señales que llevan a la expresión del factor tisular y moléculas de adhesión, causando la agregación plaquetaria y el comienzo de la trombosis (18).

En la placenta los Ac aPL compiten con la Anexina A5 (AnxA5) (anticoagulante placentario) por la fosfatidilserina (aPS), interrumpiéndose el escudo protector frente a los mecanismos trombóticos maternos y produciéndose la trombosis de los pequeños

vasos placentarios. Por otro lado los Ac aPL también inhiben la producción de prolactina placentaria y factor de crecimiento dificultando el normal funcionamiento de la placenta y causando insuficiencia placentaria, retraso intrauterino retardado y finalmente la muerte fetal (19).

En un intento de dilucidar la fisiopatología del SAF, en los últimos tiempos se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos por los que los Ac aPL podrían desencadenar una respuesta inflamatoria y protrombótica:

- 1.- Los pacientes con SAF tienen anticuerpos que reconocen a la proteína C, S y trombomodulina, alterando los sistemas de la coagulación y generando un estado protrombótico. Estos anticuerpos inhiben el sistema fibrinolítico, produciendo trombosis arteriales y venosas, aunque el mecanismo es desconocido.
- 2.- También se han identificado ciertos HLA asociados al SAF, como son el DR4, DR7 y DRw53 (20).
- 3.- Las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C, el virus herpes, los adenovirus, los parvovirus B19, la lepra, la sífilis y ciertos fármacos, pueden predisponer a la aparición de Ac aPL (21).
- 4.- El factor tisular no se expresa en la superficie celular cuando el endotelio vascular está íntegro, aunque se ha visto que entre los mecanismos inducidos para la trombosis por los Ac aPL, se encuentra la regulación de la expresión del factor tisular en monocitos y células endoteliales. La sobreproducción de factor tisular activa la vía extrínseca de la coagulación. Reverter et al (22) demostraron un aumento de factor tisular en monocitos en presencia de IgG aCL y Ac anti β 2-GPI y éste a su vez era mayor en pacientes que habían sufrido eventos trombóticos.
- 5.- Los Ac aPL interaccionan con la AnxA5 que se encuentra en la superficie de las células endoteliales. La AnxA5 es un potente anticoagulante que forma un escudo en las células endoteliales y bloquea la reacción de la coagulación. Los Ac aPL rompen esta barrera.
- 6.- La β 2-GPI es una apolipoproteína que media la unión de PL a plaquetas, monocitos, células endoteliales y trofoblasto. Se ha visto que las células mononucleares de pacientes

con SAF tienen un efecto proliferativo mayor en presencia de Ac anti β 2-GPI, puesto que es el mayor autoantígeno de los Ac aPL. El factor 4 plaquetario, se une a la β 2-GPI dimerizada y son reconocidos por los anticuerpos anti β 2-GPI. Este complejo activa las plaquetas por la vía de la MAP quinasa (proteínas quinasa activadas por mitógenos), la producción de tromboxano y la expresión del receptor GPIIb/IIIa, responsables de las manifestaciones clínicas de la trombopenia (23). En ausencia de linfocitos T CD4+, disminuye el efecto proliferativo inducido por la β 2-GPI (24). Arai et al (25) demostraron que el dominio V de la β 2-GPI es el responsable de la unión a los PL. También observaron en el sobrenadante de cultivos de mononucleares de pacientes con SAF, una elevada producción de interleuquina-6 (IL-6) e Interferón- γ (INF- γ), junto con Ac anti β 2-GPI.

7.- Los Ac aPL, producen también un aumento de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α). El TNF- α (factor de necrosis tumoral α), se libera en respuesta a la activación del complemento y se ha visto que es un mediador importante en el daño causado por los Ac aPL (26). Krause et al (27) demostraron el papel de las citocinas en el SAF en 1999. El balance en la respuesta Th1 (producen IL-2 e INF- γ) / Th2 es muy importante en la fisiopatología de la enfermedad. Visvanathan y McNeil (28) mostraron un predominio de IL-4 e INF- γ en los cultivos de mononucleares de estos pacientes, lo que sugería un desequilibrio de la respuesta inmune hacia Th1. Sugirieron que la producción aumentada de INF- γ podría estar relacionada con las pérdidas fetales, ya que durante el embarazo predomina la respuesta Th2.

Todos estos mecanismos inducidos por los Ac aPL conducen a las diferentes manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con SAF, aunque la presencia de Ac aPL persistente en el tiempo no explica todo el espectro de la enfermedad. Es decir, títulos de anticuerpos similares, con la misma especificidad de autoantígeno, se han asociado a diferentes cuadros clínicos (29). Por ejemplo, se ha visto que la IgG β 2-GPI de pacientes con SAF que han tenido trombosis venosa (TV), tienen efectos biológicos diferentes a la de las pacientes con pérdidas fetales, produciendo los primeros una inflamación e inducción protrombótica en los monocitos y los segundos una inhibición del desarrollo del trofoblasto (30).

Figura 1: Fisiopatología del SAF.

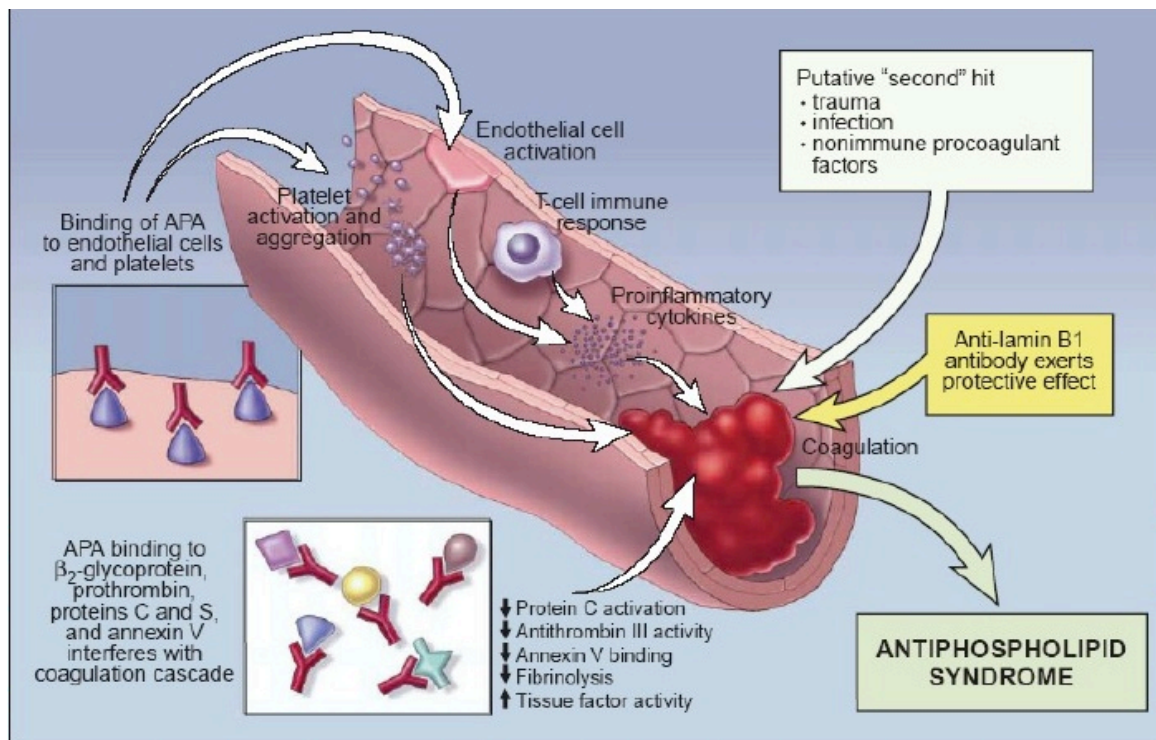


Figura tomada de <http://slideplayer.es/slide/3108975/>

3. CLÍNICA

El SAF se caracteriza por la presencia de eventos trombóticos de carácter venoso (TV) o arterial (TA) en miembros inferiores, embolia pulmonar, oclusión de grandes vasos, senos venosos, microcirculación y ACV isquémico entre otros) y morbilidad gestacional (pérdidas fetales recurrentes, preeclampsia, crecimiento intrauterino retardado, insuficiencia placentaria, etc) (31).

Existen otras manifestaciones clínicas asociadas como son la trombocitopenia, enfermedad valvular cardíaca, nefropatía, livedo reticularis, anemia hemolítica autoinmune, nefropatía, afectación ocular, hepatopatía, afectación pulmonar, esplénica, pancreática e intestinal y manifestaciones neurológicas (migraña, epilepsia, amaurosis fugaz), aunque por su menor frecuencia y especificidad, no se encuentran incluidas dentro de los criterios de diagnósticos de SAF (32).

Todas estas manifestaciones clínicas pueden presentarse de forma aislada o asociadas a algún otro tipo de enfermedad autoinmune, siendo el LES la más frecuente y definiéndose el SAF como secundario (33). Existe una fuerte relación entre LES y SAF, pudiendo presentar pacientes con LES, positividad para Ac aPL y muchos pacientes con SAF, características clínicas de LES, como puede ser la afectación neurológica. Por tanto el diagnóstico diferencial entre ambas o la persistencia de las mismas es muy importante, ya que el tratamiento será diferente dependiendo de la causa de la afectación neurológica (34).

3.1 SAF catastrófico

Existe una forma de SAF acelerada, descrita por primera vez en 1992 y cuyos criterios diagnósticos se establecieron en 2003 (35), que ocurre aproximadamente en el 1% de los pacientes con SAF y que consiste en la presencia de coagulopatías, necrosis isquémica de las extremidades y presencia de Ac aPL. Su curso es rápidamente progresivo y provoca un fallo multiorgánico (3 o más órganos que por orden de frecuencia suelen ser riñón, pulmón y sistema nervioso central). Predominan la oclusión de vasos pequeños y el dolor abdominal debido a las trombosis de órganos intra-abdominales (riñón, suprarrenales, bazo, páncreas, mesenterio, etc.). Hay que considerar una historia previa de SAF (aunque muchos de estos pacientes no la tengan), el número de órganos afectados en menos de una semana y los hallazgos histopatológicos que se corresponden con microtrombosis. En el 50% de los casos, suele haber un factor precipitante como puede ser la cirugía o alguna infección. Fue denominada “Síndrome Antifosfolípido Catastrófico” (SAFC) y presenta un 30% de mortalidad sin tratamiento (36). En este caso, debemos tener en cuenta el diagnóstico diferencial con todos los síndromes microangiopáticos (Púrpura Trombótica Trombocitopénica, Síndrome Hemolítico Urémico y Síndrome HELLP) (37).

Figura 2. Microangiopatía trombótica en biopsia renal de paciente con SAF.

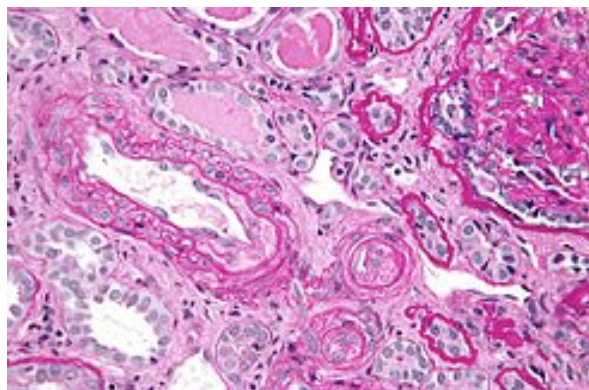


Figura tomada de https://es.wikipedia.org/wiki/Síndrome_antifosfolípidos

3.2 Redefinición de SAF

En el 14º Congreso Internacional sobre Anticuerpos Antifosfolípidos en Río de Janeiro, se examinaron las posibles manifestaciones clínicas (trombosis venosa superficial, trombocitopenia, microangiopatía renal, enfermedad valvular cardíaca, livedo reticularis, migraña, corea, convulsiones y mielitis) y fueron seleccionadas las más relevantes que podrían ser incluidas dentro de los criterios diagnósticos según el nivel de evidencia medido por el sistema GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) (38) o las tendencias futuras sobre el tratamiento. Se encontró una evidencia muy baja para migraña y convulsiones, baja para trombosis venosa superficial, trombocitopenia, corea y mielitis longitudinal y moderada para microangiopatía renal, enfermedad valvular cardíaca y livedo reticularis. La Task Force recomienda una redefinición del gold estándar para SAF, incluyendo datos del APS ACTION registry (39), teniendo en cuenta pacientes con SAF diagnosticados según los actuales criterios diagnósticos y aquellos con Ac aPL no incluidos dentro de los criterios diagnósticos (40).

En el mismo congreso, un grupo de expertos llevó a cabo una evaluación crítica sobre la literatura disponible en cuanto a la asociación de Ac aPL y manifestaciones obstétricas presentes actualmente en los criterios diagnósticos de SAF (abortos prematuros, muertes fetales, preeclampsia e insuficiencia placentaria). También se investigó la asociación entre infertilidad y Ac aPL y la eficacia de algunos tratamientos para ello. No se encontraron estudios de alta calidad que avalen la asociación entre morbilidad gestacional y positividad para Ac aPL, por lo que se recomendó la realización de nuevos estudios con

buena calidad de diseño. Tampoco existen estudios bien diseñados que apoyen el tratamiento de los eventos obstétricos relacionados con Ac aPL. No se encontraron hallazgos que recomienden el estudio o tratamiento de pacientes infértiles con SAF dentro de la práctica clínica diaria. Se han encontrado nuevos mecanismos patogénicos relacionados con la activación del complemento mediante Ac aPL que deberían ser investigados, ya que podrían ser prometedoras dianas terapéuticas en un futuro (41).

4. DIAGNÓSTICO

En 1999 se definieron por primera vez los criterios diagnósticos para el SAF y fueron denominados “Criterios de Sapporo”. Estos criterios fueron actualizados posteriormente en 2006 en otra reunión de expertos en Sydney y actualmente nos referimos a ellos como los criterios actualizados de Sapporo o criterios de Sydney (10).

El SAF debe ser considerado como un diagnóstico potencial en pacientes jóvenes con historia de eventos tromboticos o mujeres con pérdidas/abortos fetales recurrentes sin factores desencadenantes ni mutación trombofílica asociada, aunque esta última no excluya el diagnóstico de SAF. La deficiencia hereditaria de proteína C, proteína S, antitrombina III, mutaciones del factor V de Leiden, protrombina y la metileno tetrahydrofolato reductasa (MTHFR) son causas menos comunes de aborto (42). La atribución del aborto al SAF es más fiable cuando la pérdida ocurre después de la 10ª semana, habiéndose demostrado el latido cardíaco fetal, encontrándose los Ac aPL a títulos altos antes y después de la gestación y si la placenta presenta vasculopatía e infarto (43).

La presencia de Ac aPL no siempre se transforma en manifestaciones clínicas como trombosis o morbilidad gestacional. A veces los anticuerpos pueden identificarse en personas sanas.

Para el diagnóstico de SAF, se requiere la presencia objetiva y confirmada de TV/TA o morbilidad gestacional que pueda relacionarse con insuficiencia placentaria (se incluyen pérdidas fetales y partos prematuros) junto con la positividad moderada o alta de forma persistente de anticuerpos anticardiolipina, antiβ2-GPI o anticoagulante lúpico (AL) en dos determinaciones separadas al menos 12 semanas. La determinación del AL se hace de acuerdo a la ISTH (Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia), la de aCL (IgM

o IgG) cuando supera los 40 UPL (unidades de fosfolípido) y la de anti β 2-GPI cuando los títulos superan el percentil 99 (10). Debe realizarse también una historia clínica y examen físico completos.

La positividad de un solo Ac aPL se asocia con menor riesgo trombótico y de morbilidad gestacional. La persistencia y el alto título de Ac aPL, se ha relacionado con mayor riesgo de eventos trombóticos.

La presencia de Ac aCL aislado incluso a títulos moderados-altos, no se ha correlacionado con el riesgo de trombosis, aunque sí con el de morbilidad gestacional (44). En caso de trombosis aislada o asociada a morbilidad gestacional se encuentran títulos altos de Ac aCL y positividad para otros anticuerpos, por lo que se postula que la patogénesis del daño placentario y la de la trombosis podría ser diferente, al igual que los anticuerpos implicados (45). Por otro lado parece ser que la positividad aislada de Ac anti β 2-GPI no se ha relacionado con ninguna de estas dos características clínicas (46), mientras que la positividad aislada de AL sí parece estar más fuertemente asociada con ambas (47).

Posteriormente de Laat et al arrojaron más claridad sobre este tema, ya que encontraron que los Ac anti β 2-GPI con actividad AL eran los responsables de los eventos trombóticos. Mostraron que el subgrupo de Ac anti β 2-GPI que reconoce el epítipo glicina 40-arginina 43 del dominio I de la β 2-GPI, son los causantes de la actividad del anticoagulante lúpico y se correlacionan con las trombosis (48). Por tanto, habría que separar a los pacientes positivos para AL independiente de β 2-GPI, de los que son dependientes de β 2-GPI (49).

Sin embargo, se ha probado que pacientes positivos para los tres Ac aPL, ven incrementado de forma significativa su riesgo de trombosis y morbilidad gestacional (OR (odds ratio) 5-33) (50). Parece ser, que se atribuye a una subclase específica de anticuerpos anti β 2-GPI, ya que es responsable de la positividad de Ac aCL y de la actividad de AL (51). También se ha visto que estos pacientes con alto riesgo de trombosis y positividad para los tres anticuerpos a títulos altos, tienen un número mayor de anticuerpos contra el dominio I (52).

Los falsos positivos o falsos negativos en cuanto a la determinación de AL pueden ocurrir de manera frecuente si los pacientes están tomando anticoagulantes orales, por lo que en este caso, es recomendable la determinación de Ac aCL y Ac anti β 2-GPI, ya que no se afectan por estos fármacos. Algunos autores recomiendan la determinación de AL en pacientes bajo tratamiento con warfarina, cuando el INR (International Normalized Ratio) es menor a 3.5, mientras que otros recomiendan la no determinación de AL bajo este tratamiento (10). Las infecciones y algunos fármacos, también pueden ocasionar la aparición de falsos positivos en la determinación de los Ac aPL, que normalmente desaparecen al repetir el test o suspender los fármacos. De ahí la importancia de repetir los test diagnósticos para la determinación de Ac aPL, evitando exponer a estos pacientes a efectos secundarios de anticoagulación oral.

El verdadero valor diagnóstico de un resultado positivo de uno solo de estos test, está limitado por estudios de baja calidad (53).

No está recomendado hacer el cribado a individuos asintomáticos para identificar a los que tienen alto riesgo de trombosis o morbilidad gestacional. De igual forma, tampoco se recomienda la determinación de anticuerpos en aquellos individuos con trombosis que tengan otros factores de riesgo diferentes a los del SAF (54).

Resultados recientes indican que la combinación de varios de estos anticuerpos positivos, proporciona un perfil más preciso para identificar mayor gravedad (55) y más riesgo de recurrencia de la enfermedad (56). Podemos observar los criterios de Sydney en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de Sydney (2006) (10).

Criterios clínicos (1 o más de los siguientes)	Criterios de laboratorio (1 o más de los siguientes, presentes en dos o más determinaciones, separadas al menos 12 semanas)
Trombosis vascular: 1 o más episodios confirmados de TV o TA	AL determinado de acuerdo a la ISTH
Morbilidad gestacional: 1 o más muertes de fetos morfológicamente normales de más de 10 semanas; o 1 o más nacimientos prematuros antes de la 34ª semana debido a eclampsia, preeclampsia o insuficiencia placentaria; o 3 o más abortos recurrentes espontáneos en fetos de menos de 10 semanas.	IgM/IgG aCL > 40 UPL o percentil 99 mediante ELISA estandarizado
	IgM/IgG antiβ2-GPI > percentil 99 mediante ELISA estandarizado

TV: trombosis venosa, TA: trombosis arterial, AL: anticoagulante lúpico, ISTH: Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, aCL: anticardiolipinas, UPL: unidades de fosfolípidos, antiβ2-GPI: antiβ2-glucoproteína I, ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

Se ha observado, que siguiendo los criterios de Sapporo (10), se diagnostica un grupo muy homogéneo de pacientes con SAF, a expensas de excluir a otros con sospecha de esta patología que tienen Ac aPL negativos (3). En 2003, Hugh y Khamashta (57) describieron pacientes con SAF (incluido SAF catastrófico), pero con Ac aPL negativos

de forma persistente y los llamaron pacientes seronegativos para SAF (SNSAF). La frecuencia de pacientes SNSAF se desconoce en la actualidad.

Hay que prestar especial atención a estas personas, puesto que suelen presentar algún trastorno autoinmune que con el tiempo puede precipitar en un SAF.

Se ha probado en múltiples estudios, la existencia de otros Ac aPL, que podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad. Son los Ac aPL no incluidos dentro de los criterios de Sydney.

En consecuencia, ha habido en los últimos años un incremento del interés por los nuevos test para la detección de Ac aPL, que podrían ser más específicos para el diagnóstico de SAF. Estos test detectan anticuerpos contra otros PL, proteínas de unión a PL y la AnxA5 R. Sin embargo, la relevancia de estos test no ha quedado aún establecida mediante estudios prospectivos multicéntricos. A continuación, describiremos los anticuerpos incluidos en los criterios de Sydney y posteriormente los que se encuentran excluidos de los mismos.

4.1 Anticuerpos antifosfolípidos incluidos en los criterios de Sydney

1. Anticuerpos anticardiolipinas IgM e IgG.
2. Anticuerpos anti β 2-GPI IgM e IgG.
3. Anticoagulante lúpico.

4.1.1 Anticuerpos anticardiolipinas IgM e IgG

La cardiolipina es un PL con carga negativa que se expresa en la membrana celular y en la membrana mitocondrial interna. Aunque el test para la determinación de la cardiolipina es muy sensible, no es demasiado específico. Existe la posibilidad de falsos positivos en caso de enfermedades infecciosas como la sífilis, enfermedad de Lyme, VIH, citomegalovirus, etc, aunque en este caso, los Ac aPL suelen ser transitorios y con más frecuencia de la clase IgM.

La determinación de Ac aCL se realiza mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), en presencia de suero bovino con β 2-GPI, que actúa como cofactor para el reconocimiento de la cardiolipina. Los Ac aCL de pacientes con SAF son

dependientes de $\beta 2$ -GPI, mientras que los de enfermedades infecciosas son independientes (12).

IgG aCL se expresa en unidades GPL e IgM aCL en unidades MPL. Se consideran positivos los resultados a partir de 40 unidades o del percentil 99 en más de dos ocasiones, separados por un intervalo de 12 semanas (10).

Se ha comprobado en la literatura que no siempre se cumple de forma exacta con la estandarización del ELISA para la determinación de Ac aCL, lo que crea cierta problemática a la hora de comparar resultados entre diferentes estudios y diagnosticar el SAF de forma fiable, por lo que se recomienda que cada laboratorio utilice el percentil 99 de sus propios controles para determinar el valor de corte de las concentraciones promedio (58). Se han encontrado coeficientes de variación en las determinaciones de IgM e IgG aCL mayores del 50% en algunos estudios, lo que indica la amplia variabilidad en los métodos de medida, siendo imprescindible hacer la determinación en más de una ocasión (59).

4.1.2 Anticuerpos anti $\beta 2$ -glucoproteína I IgM e IgG

La $\beta 2$ -GPI es una proteína que se encuentra en el plasma de todos los individuos, aunque es más abundante en los de sexo femenino. Parece funcionar como anticoagulante natural, pero su función no está bien establecida. Es cofactor necesario para la unión de los Ac aCL a la cardiolipina. Su gen se encuentra en el cromosoma 17q23-qter y posee cinco dominios. La $\beta 2$ -GPI se une a los PL mediante secuencias peptídicas con carga positiva, inhibiendo la unión de la proteína C a los mismos y favoreciendo los eventos trombóticos (60). A su vez, se ha visto que los pacientes que presentan IgG anti $\beta 2$ -GPI inducen la expresión del factor tisular y moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-2 y VCAM 1), favoreciendo un estado protrombótico (61). Por tanto, se relaciona a estos anticuerpos como un factor de riesgo independiente para las trombosis y las complicaciones gestacionales, aunque exista controversia en cuanto a la determinación de los mismos. El test para medir anti $\beta 2$ -GPI muestra mayor especificidad que el de Ac aCL para el diagnóstico de SAF. En un 3-10% de los pacientes es el único test positivo. El umbral establecido para considerar el test como positivo es que sea $> 99\%$ de los controles. Debe tenerse en cuenta la posible interferencia de las crioglobulinas y el factor reumatoide para la determinación de anti $\beta 2$ -GPI tipo IgM (10).

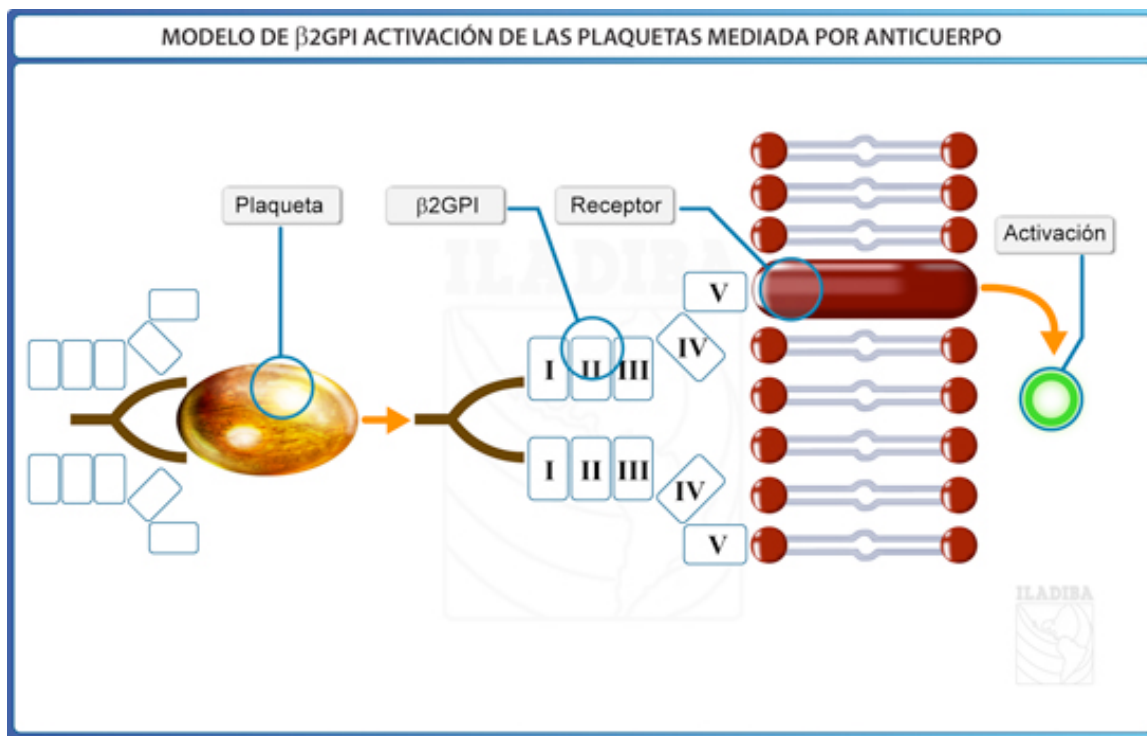
Figura 3. Activación de las plaquetas mediadas por Ac anti β 2-GPI.

Figura tomada de Diego D. Zanazzi. Síndrome antifosfolípido y afectación cardiovascular. Insuf. Card. Vol.9 no.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires jun.2014.

4.1.3 Anticoagulante lúpico

Este anticuerpo también presenta una alta correlación con la presencia de trombosis y morbilidad gestacional. La determinación del AL tiene una escasa congruencia entre los diferentes laboratorios existentes en el mercado, aunque no existe ninguna recomendación para elegir un test concreto. Tanto el tiempo parcial de tromboplastina activada (TTPa) como la dilución con veneno de Russell (dRVVT) son aptas para su determinación, aunque sí se recomienda realizar dos o más test diferentes antes de determinar el AL como negativo (62). Debe realizarse al menos un test que incluya el uso de heparina como neutralizador para poder detectar la presencia imprevista de la misma. En caso de tratamiento con anticoagulantes orales, el test debe posponerse o la muestra debe ser diluida con plasma hasta que el INR sea menor de 3.5 (no realizar en caso de que sea mayor de esta cifra) (63). Para definir la positividad de los test que miden el AL el método más fiable es el uso del ratio normalizado (muestra test : muestra control), aunque el tiempo de coagulación >1.1 para el dRVTT también es utilizado (64).

4.2 Anticuerpos antifosfolípidos no incluidos en los criterios de Sydney

1. Fosfolípido anfótero (anti-fosfatidiletanolamina) (aPE).
2. Fosfolípidos aniónicos distintos de anticuerpos anticardiolipinas (anti-ácido fosfatídico (aPa), anti-fosfatidilserina (aPS) y anti-fosfatidilinositol (aPI)).
3. Fosfolípidos de unión a proteínas plasmáticas (IgG anti-Dominio I (aDI)).
4. Anticuerpos anti-complejo vimentina/cardiolipina (aVm/CL).
5. Anticuerpos anti-protrombina (aPT) y anti-complejo fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT).
6. Resistencia a la actividad anticoagulante de la AnexinaA5 (AnxA5 R).
7. Anticuerpos IgA anticardiolipinas (IgA aCL).
8. Anticuerpos IgA anti β 2-glucoproteína I (IgA anti β 2-GPI).

4.2.1 Anticuerpos anti-fosfatidiletanolamina (aPE)

La fosfatidiletanolamina activa a la proteína C, funcionando como anticoagulante, mediante la inhibición del Factor X de la coagulación (65). El Foro Europeo de Anticuerpos Antifosfolípidos señaló en un estudio multicéntrico, que la prevalencia de aPE fue del 15% en pacientes con trombosis venosa profunda inexplicada, encontrándose como el único Ac aPL. Se demostró como un factor de riesgo independiente para TV (66). Estos anticuerpos también se han visto relacionados con las pérdidas fetales tempranas (siendo de hecho más frecuentes en mujeres infértiles, que cualquier otro Ac aPL) (67). Hirmerova et al (68), realizaron un estudio con 140 pacientes con TV, comparado con 136 controles, en donde IgM aPE fue el anticuerpo más prevalente en los pacientes con SNSAF y el único presente en el 75% de los pacientes Ac aPL positivos.

La *Task Force* menciona en sus recomendaciones la necesidad de estandarizar y validar un método de medida por ELISA para este anticuerpo, puesto que podría ser útil para los pacientes seronegativos (69).

4.2.2 Fosfolípidos aniónicos distintos de aCL (anti-ácido fosfatídico (aPA), anti-fosfatidilserina (aPS) y anti-fosfatidilinositol (aPI))

Yetman et al (70) sugieren que estos anticuerpos son útiles en casos de pérdidas fetales recurrentes en pacientes seronegativos, ya que de otra forma, no serían identificados. Gharavi et al (71) encontraron reactividad cruzada entre Ac aCL, aPS y aPI. En el

consenso del 13º Congreso Internacional de Anticuerpos Antifosfolípidos (69) se sugirió la necesidad de desarrollar un método estandarizado para detectar el SAF, porque parece ser el más prometedor y específico de todos los Ac aPL aniónicos.

4.2.3 Fosfolípidos de unión a proteínas plasmáticas IgG anti-Dominio I (aDI)

La β 2-GPI es considerado el antígeno más importante dentro del SAF, especialmente el dominio I, como el primer epitopo para los Ac aPL (72). La β 2-GPI puede presentarse en diferentes conformaciones, lo que determina si los Ac aDI pueden unirse o no a ella (73). Iverson et al (74), fueron los primeros en probar que una población específica de Ac aPL mostraba reactividad contra el dominio I. El principal epitopo está en el aminoácido 40 de la molécula Glicina/Arg39-Arg/Glicina43. La mayoría de los Ac anti β 2-GPI pierden su reactividad contra el dominio I cuando la glicina 39 o la arginina 43 están mutadas.

La presencia de Ac aDI estuvo más asociada con trombosis y morbilidad gestacional, comparada con los Ac anti β 2-GPI con reactividad hacia otros dominios (73).

Los pacientes con AL, Ac aCL y Ac anti β 2-GPI positivos, también tenían títulos altos de Ac aDI de la β 2-GPI. Éstos últimos confieren actividad AL que está asociada con alto riesgo de trombosis (48).

Realmente, hay falta de herramientas para la detección de Ac aDI, aunque existen muchos proyectos de investigación en proceso, como apunta la Task Force (70).

4.2.4 Anticuerpos anti-complejo vimentina/cardioplipina (aVm/CL)

La vimentina es la principal molécula endotelial reconocida por los Ac aPL (75). Está localizada en la superficie de los neutrófilos apoptóticos y células T, macrófagos activados, plaquetas y células del endotelio vascular (76).

Ortona et al (77) identificaron la vimentina como un autoantígeno fuertemente inmunorreactivo que era capaz de unirse in vitro a la cardioplipina en comparación con la fosfatidilcolina o la fosfatidilserina. El complejo aVm/CL, no solo se encontró en pacientes SNSAF, si no también en una gran proporción de pacientes diagnosticados de SAF, por lo que podría considerarse un nuevo antígeno en esta enfermedad, aunque también se observó una alta prevalencia en pacientes con LES (43.3%) y artritis

reumatoide (AR) (16.6%), por lo que la presencia del mismo es bastante sensible, pero no demasiado específica.

4.2.5 Anticuerpos anti-protrombina (aPT) y anti-complejo fosfatidilserina/ protrombina (aPS/PT)

Los Ac aPT, se unen a la protrombina-A y a la fosfatidilserina/protrombina. Pertenecen a diferentes familias de anticuerpos, pero están ambos correlacionados entre ellos y con múltiples características clínicas del SAF (78).

Unos altos niveles de antiprotrombina-A se asocian con gran riesgo de infarto de miocardio en hombres de mediana edad, sin enfermedad autoinmune acompañante (79).

Bizarro et al (80), identificaron IgG aPT como el predictor más útil de trombosis en pacientes con LES. Este riesgo se ve incrementado si el paciente también es seropositivo para AL, Ac aCL y Ac anti β 2-GPI (50).

Bertolaccini et al (78), también demostraron la asociación positiva entre Ac aPS/PT (IgM e IgG) y las trombosis, tanto arteriales, como venosas. Se ha demostrado que tanto la sensibilidad (81) como la especificidad (82) de los Ac aPS/PT para el diagnóstico de SAF son mayores que las de Ac aCL.

La Task Force menciona que la detección de Ac aPT-A es útil para la determinación del riesgo de trombosis junto con la determinación de otros Ac aPL, aunque se necesitan realizar más investigaciones para estandarizar el test de este anticuerpo (69).

4.2.6 Resistencia a la actividad anticoagulante de la Anexina A5 (Anx A5 R)

La Anexina A5 es una proteína anticoagulante, principalmente encontrada en el trofoblasto y las células del endotelio vascular (83).

Los Ac aPL pueden alterar este escudo anticoagulante y desenmascarar a los PL aniónicos trombogénicos, contribuyendo a la trombosis y complicaciones del embarazo en pacientes con SAF (84).

El laboratorio Rand (85) ha desarrollado un método para medir el mecanismo por el cual los Ac aPL alteran la actividad anticoagulante de la Anexina A5 en el plasma. Los resultados se expresan como el porcentaje de la prolongación de la coagulación de la Anexina A5. Aquellos pacientes que tienen los porcentajes más bajos que el rango de

referencia, son considerados resistentes a la misma. Esta resistencia se correlaciona con los Ac aPL que reconocen un epítipo en el dominio I de la β 2-GPI (86).

El Dr Rand presentó en la Task Force los datos recogidos de 5 estudios con un total de 597 pacientes. Los resultados presentados fueron, que la mitad de los pacientes con SAF sintomático, tenían AnxA5 R, mientras que solo el 2-5% de los controles y pacientes con trombosis sin SAF presentaban esta anomalía (69).

De Laat et al (87) no encontraron asociación entre la presencia de anticuerpos contra la AnxA5 y la historia de trombosis. Por otra parte, se demostró que los Ac aPL interfieren con la unión protectora de la AnxA5 al endotelio, conduciendo por tanto a la trombosis y favoreciendo la unión competitiva de los Ac anti β 2-GPI a los PL aniónicos expuestos (86). Este mecanismo se manifiesta mediante infartos de miocardio y ACV (88).

4.2.7 Anticuerpos IgA anticardiolipinas (IgA aCL)

La distribución de los isotipos de IgA depende de la etnia (3). Molina et al (89) demostraron que IgA aCL es el único isotipo presente en el 82% de los pacientes afro-caribeños positivos para aCL. La prevalencia de IgA aCL en pacientes con LES ha sido descrita desde el 1 al 44% (33, 90-91). Cucurull et al (5) demostraron asociación entre IgA aCL e IgA anti β 2-GPI en pacientes afro-americanos con LES y eventos trombóticos, aunque solo el 5% de los 100 individuos del estudio, desarrollaron trombosis. Estos autores demostraron también en el mismo estudio que los IgA aCL estaban presentes en un 51-55% de los pacientes con SAF, la mayoría, también positivos para IgG o IgM aCL, sugiriendo que la determinación de IgA, podría ayudar en el diagnóstico. Se recomienda la determinación de este anticuerpo en pacientes con alta sospecha de SAF y aCL (IgM e IgG) negativos.

También se ha demostrado asociación entre abortos espontáneos en mujeres con LES e IgA aCL positivos (92).

En el estudio SAFCORE, solo 5 muestras fueron positivas para IgA aCL, aunque la mayoría eran de pacientes con manifestaciones mayores de SAF (93).

4.2.8 Anticuerpos IgA anti β 2-GPI (IgA anti β 2-GPI)

Se ha demostrado que estos anticuerpos representan un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (infarto agudo de miocardio (94) y ACV (95)). Muchas mujeres con abortos recurrentes espontáneos de forma inexplicada y muerte fetal solo expresan el isotipo IgA de la β 2-GPI (96), siendo negativas para AL (97).

Mehrani et al (98) demostraron que los anticuerpos IgA anti β 2-GPI, están más implicados en el desarrollo de TV en pacientes con LES que los isotipos IgM anti β 2-GPI.

De igual forma, se ha visto que los pacientes con LES y SAF son más propensos a presentar los isotipos IgA (99) y que estos anticuerpos se correlacionan de forma positiva con los eventos trombóticos, por lo que se piensa que podrían reconocer el dominio IV de la β 2-GPI como su epítipo (100).

Pierangeli et al (101) presentaron los resultados de tres cohortes diferentes (LUMINA, la cohorte del Dr Petri y APLS) y concluyeron que una proporción significativa de pacientes fueron positivos para IgA anti β 2-GPI y muchos de ellos tuvieron manifestaciones de SAF, por lo que la determinación de este anticuerpo, podría identificar pacientes con características clínicas de SAF, que no cumplieran los criterios diagnósticos actuales.

La Task Force recomienda, que en caso de síntomas de LES o SAF, se deberían medir los IgA anti β 2-GPI, sobre todo cuando los Ac aPL son negativos. No obstante, también se reconocieron las limitaciones de los diferentes test para la determinación de este anticuerpo, recomendando la realización de nuevos estudios, analizando y comparando dichos test, para poder confirmar el valor de IgA anti β 2-GPI e incluirlo en los criterios diagnósticos de SAF (69).

5. TRATAMIENTO

La incidencia de trombosis en pacientes con SAF hace necesaria una terapia antitrombótica en la mayoría de los casos, aunque es difícil precisar el fármaco adecuado, el rango de anticoagulación y la duración exacta del tratamiento.

Los tratamientos más comunes para las TA y TV en el SAF son la heparina, seguida de anticoagulación por largo período con acenocumarol o warfarina. El tratamiento con estos

últimos es problemático, debido a las numerosas interacciones que presentan estos fármacos, necesitando monitorización frecuente, que puede verse artefactada por la respuesta variable de los reactantes de la tromboplastina a los Ac aPL, restando validez al tiempo de protrombina y al INR.

En pacientes diagnosticados de SAF y con un solo episodio de TV, no se han hallado diferencias entre anticoagulación en rangos estándar (INR 2-3) y rangos de alta intensidad (INR 3.1-4) (102). Estos pacientes tienen un elevado riesgo trombótico, por lo que se prefiere tratamiento anticoagulante de forma continuada, aunque se debe individualizar según cada caso. Si la persona tiene alto riesgo de sangrado o el factor precipitante del evento trombótico es reversible, se podrá optar por la anticoagulación de forma intermitente (103).

En caso de pacientes con SAF y TA, parece ser que tienen un riesgo de recurrencia mucho mayor a pesar de la anticoagulación que los pacientes con TV (104), por lo que recomiendan anticoagulación de alto rango (INR > 3), aunque no se ha evaluado de forma precisa en ensayos aleatorizados. En el 13º Congreso Internacional sobre Anticuerpos Antifosfolípidos (105) se recomendó para estos pacientes anticoagulación con INR>3 o INR 2-3 combinando con aspirina 100 mg diarios.

En aquellos pacientes con trombosis recurrentes que están anticoagulados, es necesario excluir causas como INR en rango subterapéutico, otros riesgos trombóticos y el síndrome postflebítico. Las opciones de tratamiento son aumentar el rango de INR, añadir fármacos antiplaquetarios o cambiar el tipo de anticoagulación.

Existen nuevas generaciones de anticoagulantes orales. Entre ellos se incluyen los inhibidores directos de la trombina (dabigatran etexilate) y los inhibidores directos del Factor Xa (rivaroxaban, apixaban y edoxaban). Estos anticoagulantes tienen un efecto predecible, interacciones mínimas con la dieta o el alcohol y no necesitan una monitorización rutinaria, salvo casos de sangrado, interacciones potenciales con otros fármacos, pesos corporales extremos, deterioro de la función renal, manejo perioperatorio, necesidad de reversión de la anticoagulación y sospecha de sobredosificación o mala adherencia al tratamiento (106). Los test más adecuados para medir la actividad de estos inhibidores directos son el cromogénico anti-Factor Xa y el cromogénico anti-Factor IIa en combinación con calibradores específicos y una medición

cuantitativa de la actividad tanto de rivaroxaban, apixaban o dabigatran, aunque estos test no están disponibles en todos los casos (107). Los test básicos de anticoagulación pueden utilizarse, aunque algunos reactantes del tiempo de protrombina pueden tener una baja sensibilidad y el TTPa puede prolongarse por el AL (108).

No existen fármacos neutralizantes para los anticoagulantes orales indirectos. El concentrado de factor 4 del complejo protrombínico (PCC), revierte los efectos anticoagulantes del rivaroxaban en pacientes sanos de forma completa, pero no tiene ningún efecto sobre el dabigatrán (109). En general, el manejo de los pacientes que reciben anticoagulantes orales indirectos en caso de sangrado mayor, requiere medidas de soporte y transfusión de derivados sanguíneos (PCC, inhibidor del factor VIII, factor VIIa recombinante, ácido tranexámico) y en caso del uso de dabigatrán debe tenerse en cuenta la terapia de sustitución renal.

Existen otros anticoagulantes indirectos más antiguos como son los inhibidores del factor Xa (fondaparinux, idraparinux, idrabiotaparinux y daparinoide) y los inhibidores directos de la trombina (argatroban, lepirudina y bivalirudina). Existen pocos estudios con estos anticoagulantes en pacientes con SAF, aunque la Task Force recomienda daparinoide, fondaparinux y argatroban como alternativa en pacientes con SAF que hayan desarrollado trombocitopenia inducida por heparina. No obstante, sería necesaria la creación de registros de personas en tratamiento con estos fármacos para un mejor análisis de los resultados (110).

Las recomendaciones de la Task Force sobre anticoagulación oral del 14º Congreso Internacional sobre Anticuerpos Antifosfolípidos son (106):

Los inhibidores de la vitamina K (warfarina u otros) son el principal pilar para el tratamiento, siempre y cuando no existan contraindicaciones.

Los inhibidores directos pueden utilizarse en pacientes con SAF con una primera trombosis o en caso de trombosis recurrente siempre que el nivel de anticoagulación estuviese por debajo de las recomendaciones.

No existen datos para recomendar los inhibidores directos en pacientes con SAF y trombosis recurrentes en caso de adecuados rangos de anticoagulación o cuando las trombosis sean arteriales.

Existen otros tratamientos importantes además de la anticoagulación y antiagregación tradicionales. Los describiremos a continuación:

- **Hidroxiclороquina**: tiene importantes efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y metabólicos. Desde los años 70 se probó frente a placebo que disminuía el riesgo de trombosis postoperatoria a dosis de 600-1200 mg en la población general (111). Es de elección en caso de pacientes con LES, puesto que reduce los brotes, los eventos cardiovasculares y la mortalidad. Su efecto protector frente a las trombosis ha sido demostrado en numerosas ocasiones mediante estudios prospectivos y retrospectivos (112). Estos efectos se han visto tanto en pacientes con Ac aPL positivos como negativos y en trombosis arteriales como venosas, aunque no está claro si el mecanismo por el que previene la formación de trombos es debido a un efecto sobre la enfermedad y los anticuerpos o sobre los factores de riesgo cardiovascular en general (113). Se ha observado una disminución del riesgo en pacientes con Ac aPL positivos asintomáticos sin historia de trombosis y también en pacientes con trombosis previas comparando tratamiento anticoagulante solo frente a anticoagulantes más hidroxiclороquina 400 mg diarios (114). No se sabe con claridad si el tratamiento con hidroxiclороquina puede disminuir el nivel de Ac aPL y los resultados de los estudios son bastantes contradictorios (115). Existen actualmente dos estudios en marcha sobre el tratamiento con hidroxiclороquina en pacientes con SAF. El primero evalúa el efecto del fármaco sobre la AnxA5 R en pacientes con Ac aPL positivos con o sin LES a las 6 y 12 semanas de tratamiento y también sus efectos sobre marcadores protrombóticos (116). El segundo, conocido como APS ACTION estudia la acción de hidroxiclороquina como tromboprofilaxis primaria en pacientes con SAF sin otras enfermedades autoinmunes asociadas (39). La Task Force recomienda el empleo de hidroxiclороquina en pacientes con Ac aPL positivos con LES. En pacientes aPL positivos sin otra enfermedad autoinmune no está claro el beneficio del fármaco, pero podría utilizarse en casos refractarios. La frecuencia de toxicidad retiniana se incrementa después de cinco años de uso de hidroxiclороquina o de una dosis acumulativa de 1000 g, por lo que se recomienda un examen al inicio y a los 5 años para los pacientes de bajo riesgo (sin enfermedad hepática, renal, macular o retiniana y menores de 60 años) seguido de examen anual. La toxicidad cutánea y muscular se ha visto con baja frecuencia

después de 10 años de tratamiento y la cardíaca ha sido descrita en muy pocas ocasiones (106).

- **Estatinas**: además de inhibir la síntesis de colesterol, tienen un importante efecto antiinflamatorio, antitrombótico e inmunorregulador (117). Uno de los mecanismos más importantes que desencadena la trombosis en el SAF es la activación del factor tisular. Se ha visto que el tratamiento con fluvastatina reduce los niveles del mismo y otros factores protrombóticos como IL-1 β , VEGF, TNF- α , IP10, sCD40L y sTF). Las recomendaciones de la Task Force son que las estatinas no deben darse a pacientes con SAF que no tengan hiperlipidemia, salvo casos de trombosis recurrente a pesar de adecuada anticoagulación. Se debe tener en cuenta que estos fármacos están contraindicados en embarazadas por sus efectos teratógenos. Podrían ser consideradas como tratamiento de pacientes con SAF y alto riesgo trombótico en el perioperatorio, ya que reducen la mortalidad en un 44% (118).
- **Rituximab**: la célula B interviene en el desarrollo, reactivación y persistencia de las enfermedades autoinmunes, mediante la producción de anticuerpos y citoquinas. Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico anti CD20 indicado en el tratamiento de la AR, granulomatosis con poliangitis y poliangitis microscópica (119). En casos de SAF, rituximab se ha utilizado en pacientes con trombocitopenia, anemia hemolítica, úlceras o necrosis cutánea, nefropatías y SAFc con respuestas variables (120). En el estudio RITAPS (Rituximab en APS(SAF)) se demostró que rituximab es seguro y efectivo en el control de las manifestaciones clínicas no incluidas dentro de los criterios de clasificación y podría tener un papel importante en el manejo del SAFc (121). Sobre el perfil de anticuerpos clásicos no hay ningún caso descrito de pacientes con aPL positivos que se hayan negativizado solo con este tratamiento. La Task Force recomienda el uso de fármacos inhibidores de la célula B en caso de pacientes con SAF refractario con manifestaciones hematológicas y microtrombóticas. Las diferentes dosis utilizadas para el tratamiento de la AR (1000 mg/2 semanas durante 24 semanas) y para la granulomatosis con poliangitis y poliangitis microscópica (375 mg/m²) no han sido comparadas ni se sabe si la dosis requerida en SAF podría ser diferente. Previo a la utilización de rituximab es necesaria la infusión de premedicación con 100 mg iv de metilprednisolona (106).

- **Belimumab**: es un IgG humano recombinante contra el estimulador del linfocito B soluble (BLyS) que bloquea la estimulación y autorreactivación del linfocito B. Se realizó un estudio sobre el perfil de Ac aCL (IgM, G y A) a dosis de 1mg/kg y 10 mg/kg sin resultados concluyentes (122). La Task Force recomienda realizar estudios de Belimumab en pacientes con SAF para dilucidar sus posibles acciones (106).
- **Corticosteroides** (metilprednisolona 1g diario durante 3 días): se utilizan en SAFc, junto con anticoagulación de inicio agresivo y precoz (heparina) (123) en primera línea y plasmaféresis en caso de mala respuesta a anticoagulación. También se administran corticoides, que ayudan a disminuir la mortalidad en estos pacientes e infusión de inmunoglobulinas (IV Ig), que no parece que disminuyan la mortalidad, pero son beneficiosas en caso de trombocitopenia autoinmune (124).
- **Inhibidores del complemento**: la activación del complemento, especialmente C5 contribuye al desarrollo de trombosis mediada por Ac aPL. El C5 es una molécula muy anafilactoide y con propiedades quimiotácticas que se une a su receptor, el C5aR, promoviendo el reclutamiento y activación de los neutrófilos y favoreciendo la expresión del factor tisular (125). Se ha demostrado que la ausencia o mutaciones de proteínas que regulan el complemento está asociada con enfermedades que cursan con microangiopatía y pérdidas fetales. Algunos informes de casos han documentado el uso de eculizumab (inhibidor de C5) para evitar SAF asociados a microangiopatía trombótica en trasplante renal (126) y para el tratamiento de SAFc resistentes a anticoagulación (127). La Task Force recomienda la realización de más estudios para conocer los efectos de los inhibidores del complemento en pacientes con SAF, ya que podrían tener un papel importante en aquellos pacientes con SAF refractario a tratamiento anticoagulante. Ha de tenerse en cuenta que los individuos que reciban este tipo de terapia deben ser inmunizados contra microorganismos encapsulados (106).
- **Péptidos**: la β 2-GPI posee 5 dominios que son dianas de Ac aPL. El más relacionado con la patogenia del SAF es el dominio I, aunque es necesario también el ensamblaje del dominio V con su receptor. Por lo tanto se han propuesto varias terapias de péptidos que impiden la unión de estos dominios con los fosfolípidos como terapia para la enfermedad. El principal epítipo está en el

aminoácido 40 de la molécula Glicina/Arg39-Arg/Glicina43. La mayoría de los Ac anti β 2-GPI pierden su reactividad contra el dominio I cuando la glicina 39 o la arginina 43 están mutadas y además también se ha visto que según su conformación, la fuerza de la unión a Ac aPL varía. La conformación lineal no se une con tanta avidez a los Ac aPL (128). Se han estudiado también varios péptidos del dominio V (GDKV y TIFI) que inhiben la unión a Ac aPL, reduciendo el tamaño de los trombos formados y las pérdidas fetales en ratones (129-130). La Task Force recomienda la investigación de estas moléculas con nuevos ensayos clínicos ya que los resultados in vitro y en ratones parecen prometedores y podría ser una opción terapéutica en un futuro (106).

- **Vitamina D**: la vitamina D tiene importantes funciones inmunomoduladoras y se ha visto que es frecuente la deficiencia o insuficiencia en pacientes con enfermedades autoinmunes. Se han observado resultados en estudios in vitro en los que actúa como antitrombótico inhibiendo a la β 2-GPI mediada por la expresión del factor tisular. Los niveles bajos de vitamina D se han correlacionado con TA, TV y en algunas ocasiones con las manifestaciones clínicas de SAF no incluidas dentro de los criterios diagnósticos (131-132). La Task Force recomienda por ahora reponer los niveles de vitamina D, según las guías de práctica clínica y realizar estudios para aclarar su posible efecto antitrombótico en pacientes con SAF (106).

JUSTIFICACIÓN

III. JUSTIFICACIÓN

La presencia de Ac aPL a títulos moderados o altos se asocia con más riesgo de trombosis o complicaciones obstétricas. Se sabe también que la combinación de varios Ac aPL positivos, proporciona un perfil más preciso para identificar mayor gravedad y más riesgo de recurrencia de la enfermedad. En el estudio de Pengo et al, se observó que la triple positividad de AL, Ac aCL y Ac anti β 2-GPI era un fuerte factor de riesgo independiente de trombosis (OR 33,3, IC 7,0 - 157,6), que conservó su significado cuando se consideró la asociación con la enfermedad tromboembólica venosa o arterial. La doble positividad de Ac aPL (siendo el AL negativo) también estuvo cerca de ser estadísticamente significativa para los eventos trombóticos (OR 2,2, IC 95% 1,0 - 5,2, $p = 0,056$) y resultó ser un factor de riesgo muy significativo para las complicaciones obstétricas (OR 10,8, IC 95% 2,9 - 40,8). Otras combinaciones no alcanzaron significación estadística (54).

Hace varios años que se comenzaron a plantear los Criterios diagnósticos del SAF. Incluso antes de la revisión de Sydney 2006 por Miyakis et al (10), Hughes y Khamashta (57) describieron pacientes seronegativos, como aquellos que teniendo clínica de SAF, no cumplían con los criterios de laboratorio y por lo tanto, no podían ser correctamente diagnosticados ni tratados.

Desde entonces se han hecho numerosos estudios sobre otros Ac aPL que podrían estar en relación con el desarrollo de este síndrome y en muchos de ellos se ha visto que existe una relación positiva entre su presencia y el aumento de eventos trombóticos y morbilidad gestacional. No obstante, el verdadero valor de estos anticuerpos para predecir el riesgo de trombosis se desconoce. Por este motivo nos planteamos realizar una revisión de todos los estudios hechos hasta ahora y comprobar si realmente hay asociación entre estos anticuerpos y el SAF en comparación con controles sanos y enfermos.

Los Ac aPL que parecen más prometedores dentro de este grupo no considerados para el diagnóstico de SAF son:

- aPE: han resultado positivos en el 73% de pacientes con otros Ac aPL positivos y fueron los más frecuentes en un grupo de 139 mujeres con abortos tempranos

(20.1%, $P=0.01$) y también en mujeres infértiles (67.5% de todas las que tuvieron algún aPL positivo) (133).

- aPA, aPS, aPI: en un estudio de 866 mujeres con pérdidas fetales, 807 que tuvieron Ac aCL negativos, obtuvieron un resultado positivo en alguno de estos anticuerpos (70).
- aDI, resultó positivo en 243 pacientes con historia de trombosis de un total de 442. OR 3.5:1 (IC 95% 2.3, 5.4) (48).
- La AnxA5R, resultó positiva en la mitad de los pacientes con SAF de un estudio, mientras que solo el 2-5% de los controles y pacientes con trombosis sin SAF presentaban esta anomalía (69).
- En cuanto a IgA aCL, un estudio con 100 individuos afroamericanos mostró asociación entre IgA aCL, Ac anti β 2-GPI y riesgo de trombosis, aunque solo el 5% de los 100 participantes desarrollaron trombosis posteriormente (5).
- IgA anti β 2-GPI, es uno de los anticuerpos más involucrados con el desarrollo de TV (98).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Basándonos en estudios previos, hemos formulados 2 hipótesis alternativas:

H1: existe una elevada prevalencia de Ac aPL que no están incluidos en los criterios de clasificación de pacientes con SAF.

H2: existe una relación positiva entre el número de eventos trombóticos y la presencia de Ac aPL.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la prevalencia de los Ac aPL no incluidos en los criterios diagnósticos de SAF y que están dirigidos contra otros PL, proteínas de unión a PL, factores de coagulación o test para comprobar la AnxA5 R en pacientes con SAF.

2.2 Objetivos secundarios

1. Describir las características generales de los pacientes con SAF incluidos en la revisión y compararlos con controles sanos y enfermos.
2. Conocer la prevalencia de los Ac aPL no incluidos en los criterios de clasificación en controles sanos y enfermos y compararla con la de los pacientes diagnosticados de SAF.
3. Conocer la relación entre eventos trombóticos y Ac aPL en cada uno de los subgrupos poblacionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO

Revisión sistemática de la literatura. Esta revisión fue realizada de acuerdo a las directrices de presentación de revisiones sistemáticas y metanálisis PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (134).

2. FUENTES DE INFORMACIÓN

Los estudios fueron identificados mediante búsquedas bibliográficas en Pubmed y Embase hasta junio de 2014, utilizando las palabras clave: antiphospholipid syndrome (SAF), antiphospholipid antibodies (Ac aPL), non criteria antibodies, new assays, anticardiolipin antibodies (Ac aCL), lupus anticoagulant (AL), anti-Domain I (aDI), IgA anti β 2-glycoprotein I (IgA anti β 2-GPI), antiphosphatidylserine (Ac aPS), antiphosphatidylethanolamine (Ac aPE), antiphosphatidic acid (Ac aPA), antiprothrombin (Ac aPT), antiphosphatidylserine-prothrombin (Ac aPS/PT), anti-cardiolipin/vimentin complex (Ac aVm/CL) y annexin A5 resistance (AnxA5R) con selección de los artículos relacionados con el tema a estudio (prevalencia de los Ac aPL no incluidos en los criterios de Sydney) y exclusión de aquellos que no estaban relacionados directamente con la prevalencia de estos Ac aPL. Se pusieron límites para el idioma (sólo inglés) y sólo ensayos clínicos realizados en humanos. Se identificaron artículos adicionales mediante búsqueda manual en la lista de referencias de *non criteria aPL Task Force* y otras obras de autores mediante el análisis completo de los textos. La estrategia de búsqueda electrónica se muestra en los datos suplementarios del apéndice 1 (Estrategia de búsqueda en Pubmed/Embase).

3. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE DATOS

Dos revisores independientes (IG, VR) hicieron un cribado para la selección de artículos mediante la lectura del título y el abstract, tratando de identificar cuáles eran aquellos que cumplían los criterios de inclusión de esta revisión y excluyendo los que no cumplieron los mismos. Se discutieron los diferentes puntos de vista de los revisores hasta llegar a un acuerdo y se contactó con varios autores para obtener información más detallada sobre la prevalencia de algunos anticuerpos, que se muestran posteriormente en el análisis.

4. DURACIÓN DEL SEGUIMIENTO

Se realizó una búsqueda bibliográfica incluyendo datos hasta junio de 2014.

5. SUJETOS

5.1 Población diana

Pacientes con SAF que cumplan los criterios diagnósticos de Sydney (10,135-136).

5.2 Población accesible

Pacientes con SAF, controles sanos o enfermos (pacientes con LES, ARD (otras enfermedades autoinmunes), Ac aPL positivos sin SAF, TV sin SAF, morbilidad gestacional sin SAF, test positivo para la sífilis, pacientes seronegativos para SAF y pacientes con aterosclerosis) en los que se describe la prevalencia de diferentes Ac aPL no incluidos en los criterios diagnósticos.

5.3 Criterios de inclusión

- a. Población con SAF de más de 10 sujetos.
- b. Pacientes con SAF que cumplieran los criterios diagnósticos.
- c. Descripción exacta de la prevalencia de Ac aPL no incluidos en los criterios de Sydney en los diferentes subgrupos poblacionales que tuviera cada estudio.

5.4 Criterios de exclusión

- a. Población con SAF de menos de 10 sujetos.
- b. Descripción poco objetiva de datos de prevalencia de Ac aPL no incluidos en los criterios diagnósticos en cada subgrupo de población de los diferentes estudios.
- c. Solo abstracts.

6. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Tras la realización de la búsqueda bibliográfica se procedió a la extracción sistemática de los datos por varios autores y a la realización de una base de datos cuya fiabilidad fue examinada en 10 estudios seleccionados al azar. Los datos fueron extraídos utilizando un protocolo de revisión basado en una hoja Excel que se muestra en el apéndice 2.

Posteriormente fue perfeccionada según las necesidades de cada estudio para capturar el mayor número de datos posibles. Todos los desacuerdos fueron resueltos mediante discusión. Cada estudio seleccionado fue sistemáticamente examinado, recogiendo datos de la población, intervención, comparación, objetivos y marco temporal.

7. INTERVENCIÓN

Se recogieron los diferentes métodos de medición de los Ac aPL incluidos y no incluidos dentro de los criterios diagnósticos de SAF.

8. MEDICIONES Y VARIABLES

8.1 Variables principales

- a. Prevalencia de los diferentes Ac aPL incluidos y no incluidos en los criterios diagnósticos de pacientes con SAF.
- b. Prevalencia de los diferentes Ac aPL incluidos y no incluidos en los criterios diagnósticos de controles sanos y enfermos.
- c. Subtipo de anticuerpos (IgM/IgG) para cada uno de ellos y en cada uno de los grupos.

8.2 Variables secundarias

- a. Nombre y apellidos de los autores.
- b. Título del artículo.
- c. Fecha de publicación del artículo.
- d. Diseño del estudio.
- e. Prevalencia de TA, TV y morbilidad gestacional en pacientes con SAF.
- f. Prevalencia de TA, TV y morbilidad gestacional en controles sanos y enfermos.

9. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LOS SEGOS DE LOS ESTUDIOS

Para evaluar la calidad de los estudios y el riesgo de sesgos de los mismos, esta revisión sistemática se realizó siguiendo los pasos de la declaración PRISMA 2009 (134) y su propuesta de mejora en 2010 (137). Fueron evaluados por dos autores, IG y VR. Los estudios fueron seleccionados mediante la lectura de los resúmenes y verificando que

cumplieran los criterios de inclusión establecidos. Posteriormente se procedía a la extracción de los datos necesarios para nuestro estudio mediante la hoja de extracción de datos que se muestra en el apéndice 2. En caso de no cumplir todos los criterios, o no ofrecer los datos cuantitativos reflejados en esta tabla (prevalencia de los anticuerpos de forma individual, ya fuera numérica o mediante gráficos en donde pudiera deducirse dicha prevalencia) se excluían de esta revisión.

10. ANÁLISIS ADICIONAL

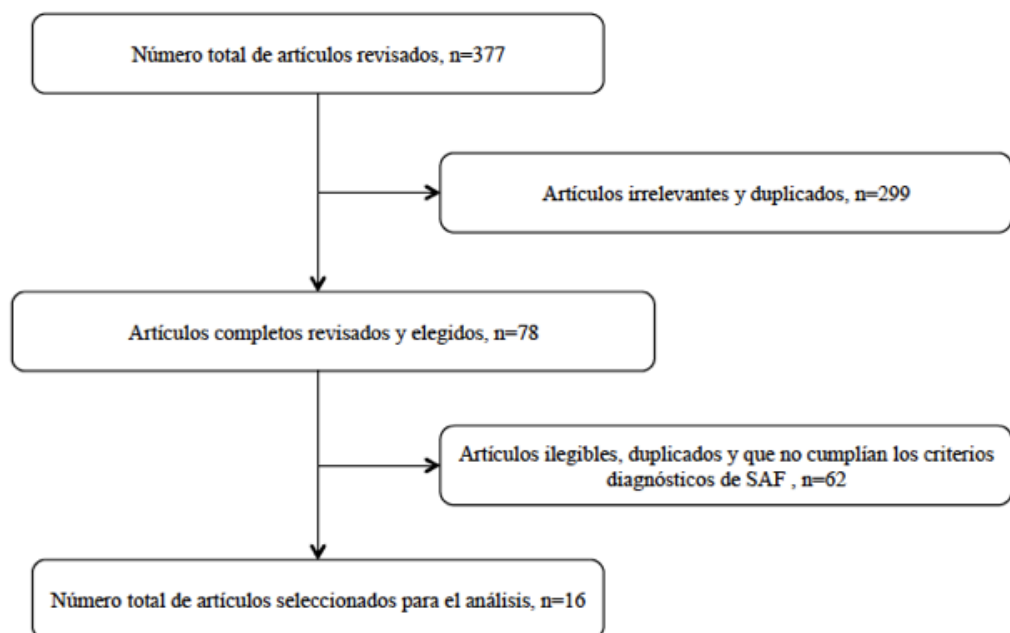
Se realizó un análisis descriptivo de las variables del estudio. La prevalencia de cada anticuerpo se calculó dividiendo el número de pacientes positivos para un anticuerpo entre el número total de pacientes con SAF. Posteriormente dividiendo el número de pacientes positivos entre el total de controles enfermos y el número de pacientes positivos entre el total de controles sanos. Para el cálculo de las p se utilizó el software Stata 10.0 (StataCorp, Texas, USA). Las variables cualitativas se compararon mediante el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher si procedía.

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

1. SELECCIÓN DE ESTUDIOS

Tras realizar la búsqueda bibliográfica en Pubmed, Embase y manual como queda reflejado en el apéndice 1, se obtuvieron 377 artículos. Mediante la lectura de títulos y resúmenes se desearon 299 artículos, algunos de ellos irrelevantes para nuestra revisión, ya que no estaban realizados para describir la prevalencia de Ac aPL y otros eran duplicados. Quedaron 78 artículos que volvieron a ser revisados por dos autores y en este caso se desearon 62. Algunos de ellos volvieron a ser irrelevantes porque trataban temas diferentes al objetivo de nuestra revisión y otros porque seguían siendo duplicados. No obstante, la mayoría de los artículos eliminados en esta segunda lectura, lo fueron debido a que no cumplían los criterios de inclusión establecidos. Finalmente seleccionamos 16 artículos para nuestra revisión, de los cuales dos fueron caso-control y catorce transversales (uno de ellos multicéntrico). El diagrama de flujo de la estrategia de selección de artículos se muestra en la Figura 1.



2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se seleccionaron 16 estudios retrospectivos que cumplieron los criterios de inclusión con 1.404 pacientes con SAF 1º o 2º, 1.839 controles enfermos y 797 controles sanos como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Número de pacientes incluidos en cada grupo del estudio.

GRUPOS DE PACIENTES	Nº PACIENTES	
SAF 1º ó 2º	1404	
CONTROLES ENFERMOS	aPL+	68
	LES	512
	Aterosclerosis	382
	Sífilis	34
	ARD	203
	SNAPS	55
	Niños con dermatitis atópica	33
	Mujeres con pérdidas fetales	328
	TV	84
	ACV	38
	Estenosis carotídea	21
	Falsos positivos VDRL	21
	Mononucleosis infecciosa	30
	VIH	30
CONTROLES SANOS	797	

aPL+: antifosfolípidos positivos, LES: lupus eritematoso sistémico, ARD: otras enfermedades autoinmunes, SNAPS: Síndrome Antifosfolípido seronegativo, TV: trombosis venosa, ACV: accidente cerebrovascular, VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

3. MEDIDA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE SYDNEY

Con la excepción de la AnxA5 R, el resto de los anticuerpos no incluidos dentro de los criterios de clasificación de SAF fueron determinados por ELISA para antígenos simples o complejos (en el caso de aPS/PT y aVm/CL). Se encontraron diferencias en cuanto a la determinación de la positividad de estos anticuerpos, como puede verse en la tabla 3.

3.1 IgA anti- β 2-glucoproteína I

Los resultados de IgA anti β 2-GPI se expresaron como densidad óptica (DO) o en unidades de unión estándar (APL) derivadas de un control positivo. Los puntos de corte de positividad, fueron determinados mediante la comparación con un número variable de controles sanos. Lee et al (139) utilizaron un test comercial en el que los resultados fueron considerados positivos si alcanzaban más de 20 unidades estándar, que resultó equivalente al percentil 98 de un grupo de 145 controles sanos.

Usando el mismo criterio, Lakos et al (138) determinaron un umbral de positividad para IgG que fue de 14.6 SGU (unidades IgG anti β 2-GPI estándar)/ml mediante ELISA. IgM/IgA anti β 2-GPI fueron expresados como DO y considerados positivos cuando estuvieron por encima de la media + 3 DS de 50 controles sanos.

Iverson et al (100) usaron el test de ELISA procedente de INOVA Diagnostic para la determinación de IgA β 2-GPI. La reproducibilidad del test fue evaluada mediante el coeficiente de variación (CV) en un solo estudio. Intra-CV (3.2-6.6%) e inter-CV (3.5-6.6%) (139).

3.2 Anticuerpos contra el DI de la β 2-glucoproteína I

Los estudios sobre IgG aDI utilizaron diferentes números de controles sanos. Dos estudios multicéntricos consideraron niveles altos de IgG aDI cuando la DO estaba por encima de la media + 3 DS de 30 (141) y 50 (140) controles sanos respectivamente, mientras que Andreoli et al (142) expresaron la positividad del IgG aDI como el percentil 95 de 100 controles sanos. Solo un estudio reportó el intra-CV (12.65%) y el inter-CV (14.82%) (141).

3.3 Resistencia a la Anexina A5

La AnxA5R fue determinada en dos pasos diferentes de un mismo proceso. Las muestras de los pacientes eran incubadas en una suspensión de PL que contenían factor tisular humano y posteriormente mezcladas con plasma en presencia y ausencia de AnxA5 que posteriormente eran recalcificadas. A continuación, se calculaba la resistencia a la actividad anticoagulante de la AnxA5. Esta actividad se expresó como una ratio de la actividad anticoagulante de la AnxA5. Tres estudios determinaron la AnxA5 R mediante comparación con diferentes números de controles sanos: 30 (141), 20 (143) y 10 (144). Un estudio reportó intra-CV (2-3.8%) e inter-CV (3.7%) (144).

3.4 Anexina A5

El ligando de la AnxA5 fue determinado mediante espectrofluorometría y considerado positivo cuando los valores estaban alrededor de la media + DS de 20 controles sanos (143-144).

3.5 IgA anticardiolipinas

Se determinó usando un calibrador comercial con los puntos de corte de positividad predefinidos (100, 138-139). Intra e inter-CV fueron similares en cada centro (<10%).

3.6 Anticuerpos anti-fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina

Los Ac IgM, IgG e IgA aPI, aPA, aPE y aPS se dieron como positivos cuando estuvieron por encima de 5 DS de un número no definido de controles sanos (146), 99% de 200 controles sanos (145) o el percentil 99 de 236 sueros control. Los resultados fueron expresados como DO delta que se define como la reactividad de cada muestra sin antígeno menos la reactividad de cada muestra con antígeno. Solo un estudio ofreció los valores de intra (7%) e inter-CV (12%) (66).

3.7 Anticuerpos anti-protrombina

La positividad para IgM e IgG aPT fue definida como: la media + 95% de 30 controles sanos (147) o en unidades de unión derivadas de la comparación con unidades de unión de alta afinidad (81), o como la media \pm 2DS de un grupo control de 26 miembros (149), o como DO con valores mayores a 5 DS por encima de la media de controles sanos

(positividad baja entre 5 y 7 DS, positividad media entre 7 y 9 DS y positividad alta como mayor de 7 DS) (148). El CV en los diferentes estudios fue respectivamente: intra-CV (IgM 6.2% e IgG 5.2%) e inter-CV (IgM 8.4% e IgG 8.8%) (147), intra-CV 7.3% e inter-CV 8.5% (149) e intra-CV IgM/IgG (9.4/13.3) (148).

Por el contrario, valores positivos para IgM e IgG aPS/PT fueron designados como mayores de 5 DS sobre la media de 36 controles sanos (81). No se reportaron CV de estos test.

3.8 Anticuerpos anti-complejo vimentina/cardioplipina

Un estudio que midió aVm/CL determinó el punto de corte como la media DO + 3DS de 30 controles sanos y no ofrecieron el CV (77).

En general, se utilizaron 2, 3 o 5 DS o el percentil 95 o 99 para definir el punto de corte de positividad de los anticuerpos no incluidos en los criterios de Sydney. La positividad de forma persistente de alguno de ellos se confirmó en un solo estudio (66). Además, otro solamente cumplió con los criterios de laboratorio internacionales para confirmar la positividad de los Ac aPL (superar el percentil 99 de controles sanos en dos o más ocasiones separados al menos 12 semanas) (10).

Tabla 3. Medida de los Ac aPL no incluidos en los criterios de Sydney.

ANTICUERPOS/ Autores	MÉTODO	PUNTOS DE CORTE	UNIDADES	COMENTARIOS
IgA β2-GPI Iverson et al (100) Lakos et al (138) Lee et al (139)	ELISA	Media+3DS (50CS) (138) 98 th (145CS) (139)	Densidad óptica (DO) (100)(138) Unidades de unión estándar IgA (139)	Tres estudios transversales multicéntricos (n=104-511) con buen intra/inter CV
IgG aDI De Laat et al (140) Hunt et al (141) Andreoli et al (142)	ELISA	Media + 3DS (50 CS) (140) media+3DS (30CS) (141) 95 th (100 CS) (142)	DO	Un estudio multicéntrico, un caso-control y uno transversal (n=154-492) en múltiples centros con moderado intra/inter-CV
AnxA5R Hunt et al (141) Wu X-X et al (143) Rand et al (144)	Test anticoagu- lante modificado	media-2DS (30CS) (141) media±2DS (20CS) (143) media±2DS (10CS) (144)	AnxA5 anticoagulante ratio	Un estudio caso-control y dos estudios transversales (n=58- 166) con un solo laboratorio y buen intra/inter-CV
Anexina A5 Wu X-X et al (143) Rand et al (144)	Espectro- fluorometría	media±DS (20 CS) (143) media±DS (20 CS) (144)	nanogramos alícuotas ⁻¹ (143) nanogramos/ pocillo (144)	Descrito anteriormente en los estudios correspondientes
IgA aCL Iverson et al (100) Lakos et al (138) Lee et al (139)	ELISA	Test comercial no indicado	DO (138) (100) Unidades estándar A (139)	Descrito anteriormente en los estudios correspondientes
aPI Branch et al (145) Bertolaccini et al (146)	ELISA	99% (200CS) (145) Media+5DS de CS (146)	DO (145) Índice de unión (146)	Dos estudios multicéntricos transversales (n=82-294)
aPA Branch et al (145) Bertolaccini et al (146)	ELISA	99% (200CS) (145) Media+5DS de CS (146)	DO (145) Índice de unión (146)	Descrito anteriormente en los estudios correspondientes
aPE Sanmarco et al (66) Branch et al (145) Bertolaccini et al (146)	ELISA	0.54 IgM/ 0.1 IgG (99 th 236 CS) (66) 99% (200CS) (145) Media+5DS de CS (146)	Delta DO (66) DO (145) Índice de unión (146)	Un estudio multicéntrico transversal (n=506) con moderado intra /inter-CV Otros estudios descritos anteriormente
aPS Branch et al (145) Bertolaccini et al (146)	ELISA	99% (200CS) (145) Media+5DS de CS (146)	DO (145) Índice de unión (146)	Descrito anteriormente en los estudios correspondientes
aPT Atsumi et al (81) Donohoe et al (147) Muñoz et al (148) Guerin et al (149)	ELISA	media+95% de 30CS (147) media+5DS de 87 controles (148) media±2DS un grupo de 26 controles (149)	% actividad (147) DO (148)	Cuatro estudios transversales (n=138-321) en múltiples centros con buen intra/inter-CV
aPS/PT Atsumi et al (81)	ELISA	Media+5DS (36 CS)	13 unidades IgM 2 unidades IgG	Estudio descrito anteriormente
aCL/Vm Ortona et al (77)	ELISA	media±3DS (30 CS)	DO	Un solo estudio transversal en un centro (n=191)

IgA anti β 2-GPI I: IgA anti β 2-glucoproteína I, IgG aDI: IgG anti-Dominio I, AnxA5R: resistencia a la actividad anticoagulante de la Anexina A5, IgA aCL: IgA anticardiolipina, aPI: anti-fosfatidilinositol, aPA: anti-ácido fosfatídico, aPE: anti-fosfatidiletanolamina, aPS: anti-fosfatidilserina, aPS/PT: anti- complejo fosfatidilserina/protrombina, APLU: unidades de IgA de anticardiolipina, CS: controles sanos, DS: desviación estándar, DO: densidad óptica, delta DO: delta densidad óptica, CV: coeficiente de variación.

4. MEDIDA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY

IgM/G anti β 2-GPI e IgM/G aCL fueron medidos por ELISA con varias definiciones de positividad como puede observarse en la tabla 2. El punto de corte para IgM/G anti β 2-GPI fue determinado mediante la media + 95% de 30 CS o la media + DS según los diferentes estudios. Las unidades de medición fueron en delta DO, DO y SGU.

Los puntos de corte para IgM/G aCL fueron valores numéricos ya dados y las unidades de medida MPLU (unidades IgM anticardiolipina) y GPLU (unidades IgG anticardiolipina).

El AL fue determinado de acuerdo a los criterios de la ISTH (150-151), recogidos también en la tabla 4 (145, 148-149).

Tabla 4. Medida de los Ac aPL incluidos en los criterios de Sydney.

ANTICUERPOS Autores	MÉTODO	PUNTOS DE CORTE	UNIDADES	COMENTARIOS
AL Sanmarco et al (66) Atsumi et al (81) Lakos et al (138) Branch et al (145) Donohoe et al (147)	Test de veneno de Russell Test de Tromboplastina diluido		TTPa	Todos los estudios se realizaron según los criterios de la ISTH(150,151) Otras características descritas en la Tabla 3
IgM/G β2-GPI Sanmarco et al (66) Lakos et al (138) Lee et al (139) De Laat et al (140) Donohoe et al (147) Muñoz et al (148) Guerin et al (149)	ELISA	0.2 IgM/ 0.1 IgG (66) media+3DS (50CS) (138) ≥ 20 unidades estándar (139) media+10DS (100CS) (140) media+95% de 30 CS (147) media+5DS (10 CS) (148) media \pm 2DS (26CS) (149)	Delta DO (66) 14.6 SGU/ml (138) DO (148)	Variables intra/inter-CV Otras características descritas en la Tabla 3
IgM/G aCL Sanmarco et al (66) Iverson et al (100) Lee et al (139) Branch et al (145) Donohoe et al (147)	ELISA	7 y 24 (66) 20 (139,145,147)	GPLU, MPLU	Variable CV. Otras características descritas en la Tabla 3

AL: anticoagulante lúpico, IgM/G β 2-GPI: IgM/G anti- β 2-glucoproteína I, IgM/G aCL: IgM/C anticardiolipina, CS: controles sanos, ISTH: Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, SGU: unidades IgG anti β 2-GP estándar, TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activado, DS: desviación estándar, GPLU: unidades IgG anticardiolipina, MPLU: unidades IgM anticardiolipina, DO: densidad óptica, delta DO: delta densidad óptica, CV: coeficiente de variación.

5. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS NO INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY

La prevalencia de estos Ac aPL en el grupo de pacientes con SAF y el grupo control está resumida en la tabla 5.

Tabla 5. Prevalencia de los Ac aPL no incluidos dentro de los criterios diagnósticos de SAF.

	SAF Nº positivos/total (% positivos)		Controles enfermos Nº positivos/total (% positivos)		Controles sanos Nº positivos/total (% positivos)		Valor de p ^a	Valor de p ^a
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
aDI	NR	241/548 (43.9)	NR	74/234 (31.6)	NR	1/30 (3.3)	NR	<0.001*
aPE	27/337 (8)	26/337 (7.7)	7/205 (3.4)	1/205 (0.5)	10/340 (2.9)	4/340 (1.2)	0.005*	<0.001*
aPT	64/180 (35.6)	68/207 (32.8)	37/366 (10.1)	194/634 (30.6)	2/117 (1.7)	3/117 (2.6)	<0.001†	0.004†
aPA	19/76 (25.0)	46/67 (68.6)	6/205 (2.9)	2/205 (0.9)	0/104 (0)	0/104 (0)	<0.001†	<0.001†
aPS	21/67 (31.3)	40/67 (59.7)	6/205 (2.9)	6/205 (2.9)	1/104 (0.9)	0/104 (0)	<0.001†	<0.001†
aPI	17/67 (25.4)	21/67 (31.3)	6/205 (2.9)	2/205 (0.9)	0/104 (0)	0/104 (0)	<0.001†	<0.001†
aPS/PT	9/44 (20.4)	19/44 (43.2)	4/217 (1.8)	10/217 (4.6)	0/0 (0)	0/0 (0)	<0.001	<0.001
aVm/CL	32/40 (80)	37/40 (92.5)	29/119 (24.3)	36/119 (30.2)	0/32 (0)	0/32 (0)	<0.001†	<0.001†
IgA aCL	48/229 (20.9)	NR	33/604 (5.4)	NR	4/145 (2.8)	NR	<0.001*	NR
IgA anti β2-GPI	129/229 (56.3)	NR	208/604 (34.4)	NR	19/145 (13.1)	NR	<0.001*	NR
AnxA5 R	87/163 (53.3)	NR	14/66 (21.2)	NR	0/91 (0)	NR	<0.001†	NR

SAF: Síndrome Antifosfolípido, IgA β2-GPI: IgA anti-β2-GPI, IgG aDI: IgG antiDominio I, AnxA5 R: resistencia a la actividad anticoagulante de la Anexina A5, IgA aCL: IgA anticardiolipina, aPI: anti-fosfatidilinositol, aPA: anti-ácido fosfatídico, aPE: anti-fosfatidiletanolamina, aPS: anti-fosfatidilserina, aPS/PT: anti-complejo fosfatidilserina/protrombina, NR: no reportado.

a Valores de p referidos a SAF vs controles sanos y enfermos.

*Chi² y †Test exacto de Fisher.

El complejo aVm/CL (77) fue el más prevalente de todos los anticuerpos no incluidos en los criterios diagnósticos de SAF: 80.0% IgM y 92.5% IgG en pacientes con SAF (n=40); 24.3% IgM y 30.2% IgG en controles enfermos (n=119); 0% IgM/G en controles sanos (n=32).

Los siguientes más prevalentes fueron aPA y aPS. Dos estudios transversales de diseño similar que diferían en el tamaño total de la población (145-146) describieron la prevalencia de aPA, aPS y aPI. Los más prevalentes fueron los Ac aPA: 25.0% IgM y 68.6% IgG en pacientes con SAF (n=67), seguidos de los Ac aPS: 31.3% IgM y 59.7% IgG en (n=67) y aPI: 25.4% IgM y 31.3% IgG en (n=67).

El siguiente anticuerpo más prevalente reportado en tres estudios fue IgA antiβ2-GPI (100,138-139) con una prevalencia de: 56.3% en pacientes con SAF (n=229), seguido de la AnxA5 R (141,143-144) con una prevalencia de 53.3% en (n=163). Estos tres últimos estudios (2 transversales y 1 caso-control) se llevaron a cabo en tres centros diferentes con la colaboración de un laboratorio, diseños similares y diferentes tamaños de población.

Posteriormente IgG aDI (1 estudio transversal, 1 caso-control y 1 multicéntrico) con una prevalencia de: 43.9% en pacientes con SAF (n=548). Los tres estudios fueron desarrollados en once centros diferentes y se compararon con grupos distintos: el primero, un estudio pediátrico con dos grupos de niños (uno con 57 niños sanos de un año, nacidos de madres con enfermedades autoinmunes y otro con 33 niños con dermatitis atópica) y un grupo de 64 pacientes con SAF (142); el segundo, un estudio con tres grupos, 120 pacientes con SAF (70 de ellos con morbilidad gestacional y 50 con trombosis venosa), 16 controles enfermos y 30 controles sanos (141) y el tercero, un estudio con dos grupos de diferente tamaño, 364 pacientes con SAF y 128 controles enfermos (140).

El siguiente fue un estudio transversal sobre Ac aPS/PT en el que no se incluyeron controles sanos (81), que reportó una prevalencia de: 20.4% IgM y 43.2% IgG en pacientes con SAF (n=44) y cuatro estudios transversales con diferentes tamaños

poblacionales (81,147-149), que encontraron una prevalencia de aPT de: 35.6% IgM y 32.8% IgG en (n=180 y n=207) pacientes con SAF.

Los anticuerpos menos prevalentes fueron IgA aCL y aPE.

La prevalencia de IgA aCL reportada en tres estudios transversales fue del: 20.9% en pacientes con SAF (n=229). Estos tres estudios se realizaron en tres centros diferentes, con diferentes tamaños de población, aunque con un diseño similar (100,138-139).

El siguiente menos prevalente fue aPE (2 estudios transversales y un caso-control multicéntrico), con una prevalencia de: 8.0% IgM y 7.7% IgG en pacientes con SAF (n=337). Estos tres estudios fueron dirigidos en once centros diferentes con tamaños de población y diseños variables (66,145-146).

6. PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY

La prevalencia de IgM/G aCL encontrada en 5 estudios (1 caso-control y 4 transversales), la prevalencia de IgM/G anti-β2GPI en 4 estudios (1 caso-control y 3 transversales) y la prevalencia de AL encontrada en dos estudios transversales, se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Prevalencia de los aPL incluidos dentro de los criterios diagnósticos de SAF.

	SAF N°. positivos/total (% positivos)		Controles enfermos N°. positivos/total (% positivos)		Controles sanos N°. positivos/total (% positivos)		Valor de p ^a	Valor de p ^a
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
aCL	49/545 (8.9)	213/545 (39.0)	25/634 (3.9)	49/634 (7.7)	10/383 (2.6)	22/383 (5.7)	<0.0001*	<0.0001*
Antiβ2-GPI	94/440 (21.3)	102/440 (23.1)	51/329 (15.5)	28/329 (8.5)	9/381 (2.3)	5/381 (1.3)	<0.0001*	<0.0001*
AL	67/340 (19.7)		33/107 (30.8)		5/236 (2.1)		<0.0001*	

SAF: Síndrome Antifosfolípido, aCL: anticardiolipinas, Anti- β 2-GPI: anti β 2-glucoproteína I, AL: anticoagulante lúpico.

a Valores de p referidos a SAF vs controles sanos y enfermos.

*Chi² y †Test exacto de Fisher.

El anticuerpo más prevalente fue aCL (1 estudio caso-control y 4 transversales) con una prevalencia de: 8.9% IgM y 39% IgG en pacientes con SAF (n=545); 3.9% IgM y 7.7% IgG en controles enfermos (n=634); 2.6% IgM y 5.7% IgG en controles sanos (n=383).

El siguiente anticuerpo más prevalente fue IgM/G anti β 2-GPI (1 estudio caso-control y 3 transversales) con una prevalencia de: 21.3% IgM y 23.1% IgG en pacientes con SAF (n=440) y posteriormente el AL (2 estudios transversales) con una prevalencia de: 19.7% en pacientes con SAF (n=340).

7. RELACIÓN ENTRE EVENTOS TROMBÓTICOS Y LOS ANTICUERPOS NO INCLUIDOS EN LOS CRITERIOS DE SYDNEY

La frecuencia y la fuerza de asociación entre los Ac aPL incluidos en los criterios de diagnósticos de SAF y las manifestaciones clínicas varió en los diferentes estudios y ninguno de ellos destacó como el mejor predictor de complicaciones trombóticas u obstétricas en el SAF. Desafortunadamente, no tuvimos la oportunidad de examinar si algún anticuerpo de los estudiados no incluido en los criterios diagnósticos, se asoció con más frecuencia a alguna manifestación clínica concreta de SAF, ya que ningún estudio dio un desglose adecuado de esta información y solo aportaron cifras globales de prevalencia de anticuerpos en su conjunto.

DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

En esta revisión sistemática hemos identificado una alta prevalencia de Ac aPL que no se encuentran actualmente incluidos dentro de los criterios de Sydney. Estos Ac aPL presentan una frecuencia considerablemente más alta en pacientes con SAF que en controles enfermos o sanos. Los IgA anti β 2-GPI fueron los más prevalentes (129/229, 56.3%), en el grupo de pacientes diagnosticados de SAF, seguidos de la AnxA5 R (87/163, 53.3%) e IgG aDI (241/548, 43.9%). De todas formas, todos los anticuerpos no incluidos en los criterios diagnósticos que fueron estudiados, presentaron una prevalencia más alta en pacientes con SAF, en comparación con controles enfermos y sanos.

La mayoría de los estudios fueron de tamaños muestrales pequeños y solo seis Ac aPL fueron estudiados en cohortes de más de 100 pacientes: aDI (n=548), aPE (n=337), IgA aCL (n=229), IgA anti β 2-GPI (n=229), aPT (n=207) y la AnxA5 R (n=163). El resto de análisis se realizaron en pequeñas cohortes (n \leq 100): aPA (n=76), aPI (n=67), aPS (n=67), aPS/PT (n=44) y aVm/CL (n=40). En general, la prevalencia más alta fue para: IgG (37/40, 92.5%) e IgM (32/40, 80.0%) aVm/CL en un estudio en un solo centro; IgG aPA (46/47, 68.6%) en dos estudios de cinco centros diferentes; IgG aPS (40/67, 59.7%) también en dos estudios de cinco centros diferentes; e IgG aPS/PT (19/44, 43.2%). El pequeño tamaño de las muestras y el número de centros involucrados en estos estudios, hace menos certera la alta prevalencia encontrada de estos anticuerpos.

A pesar de que la mayoría de los ensayos clínicos se basan en ELISA, encontramos una gran variación en la metodología utilizada para obtener los puntos de corte positivos para cada anticuerpo. En particular, el número de controles sanos varió desde 236 muestras hasta 20-50 controles, utilizados en la mayoría de los estudios. Por otra parte, se utilizaron 2, 3 o 5 DS o 95% y 99% para generar los valores de corte y la persistencia de la positividad de los anticuerpos solo se confirmó en un estudio (66). Por tanto, solo un estudio cumplió los criterios internacionales de laboratorio para la confirmación de Ac aPL positivos (10).

Además, hubo una gran variabilidad en el grupo de controles enfermos utilizado, con un déficit relativo de pacientes con enfermedad trombótica u obstétrica no asociada a enfermedades autoinmunes, en comparación a los que sí estuvieron asociados. Solo 5/16

estudios contaron con controles afectados y no afectados por enfermedades autoinmunes además de controles sanos.

En conjunto, 12/16 de los ensayos clínicos, incluyeron pacientes que cumplieron los criterios de clasificación de SAF originales o revisados. Cuatro de ellos (138,145-146,149) no cumplieron estos criterios porque fueron realizados antes de que se publicaran en 1999 (135). Cabe destacar que solo dos comprobaron con claridad la positividad persistente de los Ac aPL incluidos en los criterios de Sydney, utilizando el percentil 99 (p ej. por encima de 2.58 DS) como punto de corte positivo (145-146). Estudios posteriores que no cumplieron con los criterios de clasificación de SAF, fueron excluidos de nuestro análisis.

Otras consideraciones de relevancia sobre estos hallazgos fueron: la fiabilidad (CV) dentro de cada centro, la reproducibilidad por otros grupos independientes y el diseño de los estudios. El CV fue proporcionado en 6/16, 37.5% de los estudios con un intra/inter CV <10% (n=4) o 10-15% (n=2), confirmando una buena fiabilidad relativa en menos de la mitad de los mismos. Los resultados de la mayoría de ellos (11/16, 68.7%) sobre Ac aPL no incluidos en los criterios diagnósticos, fueron reproducidos en varios grupos independientes, excepto los estudios sobre AnxA5 R, aVm/CL y aPS/PT que se desarrollaron en un solo centro, aunque el de aPS/PT ha sido ampliamente utilizado en otros estudios sobre la patogénesis de SAF. Se encontraron diferencias en los diseños y solo 4/16 (25%), fueron diseñados desde un principio para identificar la prevalencia de los anticuerpos.

Como mencionamos anteriormente, la frecuencia y fuerza de asociación entre los Ac aPL incluidos en los criterios de Sydney y las manifestaciones clínicas varió en los diferentes estudios y ninguno de ellos destacó como mejor predictor de complicaciones trombóticas u obstétricas en el SAF. No tuvimos la oportunidad de examinar si algún anticuerpo de los no incluidos en los criterios diagnósticos estudiados en esta revisión, se asoció con más frecuencia a alguna manifestación clínica concreta, debido a que ninguno aportó un desglose adecuado de esta información y solo cifras globales de prevalencia de varios anticuerpos en su conjunto.

No consideramos la posibilidad de haber pasado por alto muchos artículos importantes, especialmente sobre IgA aCL, porque nuestra primera pregunta en esta revisión fue

identificar la prevalencia de los anticuerpos no incluidos en los criterios de Sydney en pacientes con SAF y posteriormente, comparar esta prevalencia con controles de esos mismos estudios. De todas formas, nuestra PICO (tipo de paciente, tipo de intervención, alternativa a la intervención que queremos valorar y resultados) requería que los pacientes cumplieran los criterios de diagnósticos de SAF, por lo que se excluyeron muchos artículos que hablaban sobre la prevalencia de los anticuerpos estudiados en pacientes con otras enfermedades, sobre todo LES. Por tanto, muchos estudios sobre IgA aCL que fueron llevados a cabo en pacientes con LES, se excluyeron. De hecho, fue sorprendente el escaso número de artículos que proporcionaban la prevalencia de Ac aPL en pacientes diagnosticados de SAF.

La alta prevalencia de IgG aDI, IgA anti β 2-GPI y AnxA5 R en los estudios más grandes es interesante, porque estos anticuerpos se han implicado de una forma importante en la patogénesis del SAF. Se ha demostrado que tanto el aDI de suero de pacientes con SAF (152) como el IgG aPL que se une al DI (153) son protrombóticos in vivo (154-155). En el mismo modelo de ratón, se ha demostrado que el DI recombinante humano abole la trombosis inducida por Ac aPL (156). De forma independiente, usando un modelo in vivo diferente de IgG aDI humano, se ha demostrado que es protrombótico y causa muertes fetales en ratones (157). Se han reportado un número importante de estudios, utilizando fuentes diferentes de aDI. El estudio de De Laat et al (140), que cumplió nuestros criterios de inclusión, usó un test en el que se comparaba la unión dependiente del DI en placas hidrofóbicas e hidrófilas (48). Se ha desarrollado también una fase sólida de aDI para testar suero de pacientes, aunque solo se ha publicado en formato abstract (158), por lo que no era adecuado para la inclusión en esta revisión sistemática.

Es interesante señalar que la positividad aislada de IgA anti β 2-GPI (en pacientes negativos para IgM/IgG ACL/ anti β 2-GPI y AL) se ha visto asociada con trombosis venosas y aumento de la morbi-mortalidad gestacional (159) y que la IgA anti β 2-GPI purificada, es protrombótica in vivo (160).

La AnxA5 R se une en bicapas de PL en las membranas celulares formando un escudo anticoagulante que previene la interacción de los PL con las enzimas de la coagulación. Los Ac aPL rompen este escudo, exponiendo a los PL y acelerando las reacciones de coagulación de la sangre (161). Esta interacción mediada por Ac aPL es revertida por la hidroxiclороquina que inhibe la formación de complejos IgG β 2-GPI y facilitando la

formación de un segundo estrato de parches de AnxA5 sobre las áreas donde los complejos inmunes interrumpieron la cristalización de la misma (116). Curiosamente, la AnxA5 R se ha relacionado con los Ac aPL que reconocen el epítipo del dominio I de la β 2-GPI (69).

1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1. Tuvimos numerosas limitaciones en nuestra revisión, aunque las más importantes fueron el pequeño tamaño muestral y la falta de validación de los métodos de determinación de los Ac aPL no incluidos dentro de los criterios diagnósticos de SAF.
2. Inicialmente encontramos un gran número de artículos, pero la falta de cumplimiento de los criterios de inclusión y la dificultad para la extracción de datos, causó que el número de pacientes se redujera de forma considerable.
3. Tenemos algunos estudios previos a 1999 en los que no conocemos el punto de corte exacto para Ac aCL (138,146).
4. Solo tres estudios utilizaron más de 50 controles sanos (66,142,145) y solo dos definieron la positividad de los anticuerpos por encima del percentil 99 (66,145).
5. aPT, aPA, aPI, aPS, aPS/PT y aVm/CL han sido testados en cohortes de menos de 100 pacientes.

CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. Hemos identificado una alta prevalencia de diversos Ac aPL no incluidos en los criterios de Sydney en pacientes con SAF en comparación con controles. Estos hallazgos se ven atenuados por el amplio y variable rango de los tamaños muestrales y la metodología utilizada para medir los diferentes anticuerpos.
2. Los estudios para detectar IgA anti β 2-GPI, AnxA5 R e IgG aDI son de particular interés porque han demostrado un potencial importante en la patogénesis del SAF. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios, especialmente prospectivos, de tamaño suficiente y con la metodología apropiada para determinar estos anticuerpos, tanto en pacientes diagnosticados de SAF como en controles. Sería muy interesante la determinación de los mismos de forma apropiada para poder manejar a los pacientes y saber si son de verdadera utilidad, pudiendo plantear entonces su inclusión en los criterios diagnósticos de SAF.
3. De un total de 4040 pacientes, 1.404 fueron enfermos con SAF 1º o 2º, 1.839 controles enfermos y 797 controles sanos (CS). Dentro de los controles enfermos tuvimos una gran variedad de pacientes: Ac aPL+, diagnosticados de LES, aterosclerosis, ARD, SNAPS, niños con dermatitis atópica, personas con TV o AT, ACV, estenosis carotídea, falsos positivos para VDRL, mononucleosis infecciosa y VIH. La frecuencia y la fuerza de asociación entre los Ac aPL incluidos en los criterios diagnósticos de SAF y las manifestaciones clínicas varió en los diferentes estudios y ninguno de ellos destacó como mejor predictor de complicaciones trombóticas u obstétricas.
4. No tuvimos la oportunidad de examinar si algún anticuerpo de los no incluidos en los criterios diagnósticos de los estudiados en esta revisión, se asoció con más frecuencia a alguna manifestación clínica concreta, debido a que ninguno aportó un desglose adecuado de esta información y solo cifras globales de prevalencia de anticuerpos en su conjunto.

ABREVIATURAS

IX. ABREVIATURAS

Ac: anticuerpos.

aCL: anticardiolipinas.

aCL/Vm: anti-complejo vimentina/cardioplipina.

ACV: accidente cerebrovascular.

aDI: anti-dominio I.

AL: anticoagulante lúpico.

anti β 2-GPI: anti β 2-glicoproteína I.

AnxA5: AnexinaA5.

AnxA5 R: resistencia a la actividad anticoagulante de la AnexinaA5.

aPA: anti-ácido fosfatídico.

aPE: anti-fosfatidiletanolamina.

aPI: anti-fosfatidilinositol.

aPL: antifosfolípidos.

APLU: unidades de IgA anticardiolipina.

APS: acrónimo inglés Antiphospholipid Syndrome.

aPS: anti-fosfatidilserina.

aPS/PT: anti-complejo fosfatidilserina/protrombina.

aPT: anti-protrombina.

AR: Artritis reumatoide.

ARD: otras enfermedades autoinmunes.

aVm/CL: anti-complejo vimentina cardioplipina.

CS: controles sanos.

CV: coeficiente de variación.

DO: densidad óptica.

dRVVT: dilución con veneno de Russell.

DS: desviación estándar.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

etc: etcétera.

GPLU: unidades IgG anticardiolipina.

GRADE: Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation.

HLA: antígeno leucocitario humano.

IgA anti β 2-GPI: IgA anti β 2-glucoproteína I.

Il 1, 4, 6 y 8: interleuquina 1, 4, 6 y 8.

INF- γ : interferón γ .

INR: International Normalized Ratio.

ISTH: Sociedad internacional de Trombosis y Hemostasia.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

MPLU: unidades IgM anticardiolipina.

MTHFR: metileno tetrahidrofolato reductasa.

OR: odds ratio.

PCC: concentrado de factor 4 del complejo protrombínico.

PICO: tipo de paciente, tipo de intervención, alternativa a la intervención que queremos valorar y resultados.

PL: fosfolípidos.

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses.

RITAPS: Rituximab en APS (acrónimo inglés de SAF).

SAF: Síndrome antifosfolípido.

SAFC: Síndrome antifosfolípido catastrófico.

Síndrome HELLP: síndrome con hemólisis, aumento de enzimas hepáticas y trombocitopenia.

SGU: unidades IgG anti β 2-GPI estándar.

SMU: unidades IgM anti β 2-GPI estándar.

SNSAF: Síndrome antifosfolípido seronegativo.

TA: trombosis arterial.

TV: trombosis venosa.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activado.

UPL: unidades de fosfolípidos.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

AGRADECIMIENTOS

X. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna u otra manera han hecho posible este trabajo.

Al Departamento de Reumatología de University College of London Hospital, especialmente al Dr I. Giles, al Prof D. Isenberg y todo su equipo por su gran ayuda para realizar este proyecto, ya que sin su colaboración no hubiera sido posible.

A mis compañeros/as del servicio de Reumatología del Hospital Regional de Málaga, por todo el apoyo e ilusión que me han transmitido para trabajar e investigar; especialmente a mi director de tesis, el Prof. Antonio Fernández Nebro, por todas sus enseñanzas y su inestimable contribución a este trabajo. A Mari e Isa por la ayuda tan importante recibida para la realización de la tesis y a Sara, Mamen, Laura, Natalia, Carla y Marta por su apoyo.

A mi familia, por su apoyo y esfuerzo que han permitido poder alcanzar todas mis metas personales y profesionales hasta el momento. A mis amigos más cercanos que también han contribuido a que pudiera terminar este trabajo. Gracias.

BIBLIOGRAFÍA

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Bowie EJ, Thompson JHJ, Pascuzzi CA, Owen CAJ. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med.* 1963 Sep;62:416–30.
2. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol.* 1986 Jun;13(3):486–9.
3. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Saad Aldin E, Merashli M, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Oxf Engl.* 2013 Aug;52(8):1358–67.
4. de Groot PG. Mechanisms of anti-phospholipid antibody formation and action. *Thromb Res.* 2011 Feb;127 Suppl 3:S40–2.
5. Cucurull E, Gharavi AE, Diri E, Mendez E, Kapoor D, Espinoza LR. IgA anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I are the most prevalent isotypes in African American patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci.* 1999 Jul;318(1).
6. Levine SR, Brey RL, Sawaya KL, Salowich-Palm L, Kokkinos J, Kostrzema B, et al. Recurrent stroke and thrombo-occlusive events in the antiphospholipid syndrome. *Ann Neurol.* 1995 Jul;38(1):119–24.
7. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril.* 1996 Jul;66(1):24–9.
8. Kamboh MI, Manzi S, Mehdi H, Fitzgerald S, Sanghera DK, Kuller LH, et al. Genetic variation in apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I) affects the occurrence of antiphospholipid antibodies and apolipoprotein H concentrations in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1999;8(9):742–50.
9. Nunez-Alvarez CA, Cabiedes J. [Pathogenic mechanisms of the anti-phospholipid

antibodies]. *Reumatol Clin*. 2011 Feb;7(1):72–6.

10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Feb;4(2):295–306.

11. Gomez-Puerta JA, Martin H, Amigo M-C, Aguirre MA, Camps MT, Cuadrado MJ, et al. Long-term follow-up in 128 patients with primary antiphospholipid syndrome: do they develop lupus? *Medicine (Baltimore)*. 2005 Jul;84(4):225–30.

12. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002 Mar 7;346(10):752–63.

13. Alarcon-Segovia D, Estanol B, Garcia-Ramos G, Villa AR. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome. Clinical relevance in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Aug 14;823:279–88.

14. Cordeiro MF, Lloyd ME, Spalton DJ, Hughes GR. Ischaemic optic neuropathy, transverse myelitis, and epilepsy in an anti-phospholipid positive patient with systemic lupus erythematosus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Sep;57(9):1142–3.

15. Martinez-Rueda JO, Arce-Salinas CA, Kraus A, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. Factors associated with fetal losses in severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1996 Apr;5(2):113–9.

16. Lockshin MD. Why do patients with antiphospholipid antibody clot? *Lupus*. 1997;6(4):351–2.

17. Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Jul;3(7):1392–406.

18. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Ziporen L, Piette JC, et al. Anti-endothelial cell antibody binding makes negatively charged phospholipids accessible to

antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 1998 Oct;41(10):1738–47.

19. Rand JH. Molecular pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Circ Res.* 2002 Jan 11;90(1):29–37.

20. Doring Y, Hurst J, Lorenz M, Prinz N, Clemens N, Drechsler MD, et al. Human antiphospholipid antibodies induce TNF α in monocytes via Toll-like receptor 8. *Immunobiology.* 2010 Mar;215(3):230–41.

21. Peluso S, Antenora A, De Rosa A, Roca A, Maddaluno G, Brescia Morra V, et al. Antiphospholipid-related chorea. *Front Neurol.* 2012;3:150.

22. Reverter JC, Tassies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum.* 1998 Aug;41(8):1420–7.

23. Holers VM, Girardi G, Mo L, Guthridge JM, Molina H, Pierangeli SS, et al. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Exp Med.* 2002 Jan 21;195(2):211–20.

24. Kuwana M. Autoreactive CD4(+) T cells to beta(2)-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2003 Jun;2(4):192–8.

25. Arai T, Yoshida K, Kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y, et al. Autoreactive CD4(+) T-cell clones to beta2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome: preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood.* 2001 Sep 15;98(6):1889–96.

26. Berman J, Girardi G, Salmon JE. TNF- α is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Jan 1;174(1):485–90.

27. Krause I, Blank M, Levi Y, Koike T, Barak V, Shoenfeld Y. Anti-idiotypic

immunomodulation of experimental anti-phospholipid syndrome via effect on Th1/Th2 expression. *Clin Exp Immunol*. 1999 Jul;117(1):190–7.

28. Visvanathan S, McNeil HP. Cellular immunity to beta 2-glycoprotein-1 in patients with the antiphospholipid syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Jun 1;162(11):6919–25.

29. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jun;7(6):330–9.

30. Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, Pericleous C, Branch W, Rice J, et al. Effects of polyclonal IgG derived from patients with different clinical types of the antiphospholipid syndrome on monocyte signaling pathways. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jun 15;184(12):6622–8.

31. Alarcon-Segovia D, Sanchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol*. 1989 Apr;16(4):482–8.

32. Erkan D, Lockshin MD. Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010 Apr;19(4):424–7.

33. Alarcon-Segovia D, Deleze M, Oria CV, Sanchez-Guerrero J, Gomez-Pacheco L, Cabiedes J, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*. 1989 Nov;68(6):353–65.

34. Emmi G, Silvestri E, Squatrito D, Ciucciarelli L, Cameli AM, Denas G, et al. An approach to differential diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome and related conditions. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:341342.

35. Asherson RA, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus*. 2003;12(7):530–4.

36. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome, 1998. A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. *Lupus*. 1998;7 Suppl 2.
37. Asherson RA, Cervera R. Microvascular and microangiopathic antiphospholipid-associated syndromes (“MAPS”): semantic or antisemantic? *Autoimmun Rev*. 2008 Jan;7(3):164–7.
38. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2008 Apr 26;336(7650):924–6.
39. Erkan D, Lockshin MD. APS ACTION--AntiPhospholipid Syndrome Alliance For Clinical Trials and InternatiOnal Networking. *Lupus*. 2012 Jun;21(7):695–8.
40. Abreu MM, Danowski A, Wahl DG, Amigo M-C, Tektonidou M, Pacheco MS, et al. The relevance of “non-criteria” clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Clinical Features. *Autoimmun Rev*. 2015 May;14(5):401–14.
41. de Jesus GR, Agmon-Levin N, Andrade CA, Andreoli L, Chighizola CB, Porter TF, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force report on obstetric antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2014 Aug;13(8):795–813.
42. Spitzer KA, Clark CA, Laskin AS, et al. Prevalence of inherited thrombophilias in women with unexplained recurrent pregnancy loss (Abstract). *Arthritis Rheum*. 2002;46:S231.
43. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, et al. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood*. 1995 Nov 15;86(10):3685–91.

44. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M, Bortolati M, Bison E, Salvan E, et al. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost JTH*. 2008 Oct;6(10):1693–6.
45. Mackworth-Young CG. Antiphospholipid syndrome: multiple mechanisms. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jun;136(3):393–401.
46. Brey RL, Abbott RD, Curb JD, Sharp DS, Ross GW, Stallworth CL, et al. beta(2)-Glycoprotein 1-dependent anticardiolipin antibodies and risk of ischemic stroke and myocardial infarction: the honolulu heart program. *Stroke J Cereb Circ*. 2001 Aug;32(8):1701–6.
47. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1827–32.
48. de Laat B, Derksen RHW, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1540–5.
49. de Laat HB, Derksen RHW, Urbanus RT, Roest M, de Groot PG. beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3598–602.
50. Forastiero R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L, et al. A prospective study of antibodies to beta2-glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Jun;3(6):1231–8.
51. Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, Cavazzana A, Grava C, Noventa F, et al. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. *Thromb Haemost*. 2006 Sep;96(3):337–41.
52. Banzato A, Pozzi N, Frasson R, De Filippis V, Ruffatti A, Bison E, et al.

Antibodies to Domain I of beta(2)Glycoprotein I are in close relation to patients risk categories in Antiphospholipid Syndrome (APS). *Thromb Res.* 2011 Dec;128(6):583–6.

53. Garcia D, Akl EA, Carr R, Kearon C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review. *Blood.* 2013 Aug 1;122(5):817–24.

54. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, Marongiu F, Erba N, Veschi F, et al. Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost JTH.* 2007 May;5(5):925–30.

55. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2005 Jun;93(6):1147–52.

56. Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus.* 2010 Apr;19(4):432–5.

57. Hughes GRV, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2003 Dec;62(12):1127.

58. Pengo V. APS--controversies in diagnosis and management, critical overview of current guidelines. *Thromb Res.* 2011 Feb;127 Suppl 3:S51–2.

59. Favaloro EJ, Silvestrini R. Assessing the usefulness of anticardiolipin antibody assays: a cautious approach is suggested by high variation and limited consensus in multilaboratory testing. *Am J Clin Pathol.* 2002 Oct;118(4):548–57.

60. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jun;87(11):4120–4.

61. Oosting JD, Derksen RH, Blokzijl L, Sixma JJ, de Groot PG. Antiphospholipid antibody positive sera enhance endothelial cell procoagulant activity--studies in a thrombosis model. *Thromb Haemost.* 1992 Sep 7;68(3):278–84.
62. Arnout J, Meijer P, Vermeylen J. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta2-glycoprotein I. *Thromb Haemost.* 1999 Jun;81(6):929–34.
63. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with StacLOT LA. *Thromb Haemost.* 2002 Oct;88(4):583–6.
64. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. Lupus Anticoagulant Working Party on behalf of the BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol.* 1991 Nov;44(11):885–9.
65. Tsuda T, Yoshimura H, Hamasaki N. Effect of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine on the activated factor X-prothrombin system. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 2006 Sep;17(6):465–9.
66. Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C, Audrain M, de Maistre E, Gris J-C, et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost.* 2007 Jun;97(6):949–54.
67. Gardiner C, Hills J, Machin SJ, Cohen H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus.* 2013 Jan;22(1):18–25.
68. Hirmerova J, Ulcova-Gallova Z, Seidlerova J, Filipovsky J, Bibkova K, Micanova

Z, et al. Laboratory evaluation of antiphospholipid antibodies in patients with venous thromboembolism. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 2010 Jun;16(3):318–25.

69. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de Laat B, Forastiero R, et al. “Non-criteria” aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus*. 2011 Feb;20(2):191–205.

70. Yetman DL, Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertil Steril*. 1996 Oct;66(4):540–6.

71. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis*. 1987 Jan;46(1):1–6.

72. de Laat B, Derksen RHW, van Lummel M, Pennings MTT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1916–24.

73. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep*. 2011 Feb;13(1):70–6.

74. Iverson GM, Victoria EJ, Marquis DM. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15542–6.

75. Boilard E, Bourgoin SG, Bernatchez C, Surette ME. Identification of an autoantigen on the surface of apoptotic human T cells as a new protein interacting with inflammatory group IIA phospholipase A2. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2901–9.

76. Podor TJ, Singh D, Chindemi P, Foulon DM, McKelvie R, Weitz JI, et al. Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin

and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7529–39.

77. Ortona E, Capozzi A, Colasanti T, Conti F, Alessandri C, Longo A, et al. Vimentin/cardiophilin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):2960–7.

78. Bertolaccini ML, Atsumi T, Koike T, Hughes GRV, Khamashta MA. Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems. Prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost*. 2005 Feb;93(2):289–97.

79. Vaarala O, Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost*. 1996 Mar;75(3):456–9.

80. Bizzaro N, Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, Tozzoli R, Ruffatti A, et al. Anti-prothrombin antibodies predict thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus: a 15-year longitudinal study. *J Thromb Haemost JTH*. 2007 Jun;5(6):1158–64.

81. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum*. 2000 Sep;43(9):1982–93.

82. Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus*. 2010 Apr;19(4):436–9.

83. Frank M, Sodin-Semrl S, Irman S, Bozic B, Rozman B. Beta2-glycoprotein I and annexin A5 phospholipid interactions: artificial and cell membranes. *Autoimmun Rev*. 2009 Sep;9(1).

84. Rand JH, Wu XX, Andree HA, Ross JB, Rusinova E, Gascon-Lema MG, et al. Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a “lupus procoagulant” phenomenon. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1652–60.

85. de Laat B, Wu X-X, van Lummel M, Derksen RHWM, de Groot PG, Rand JH. Correlation between antiphospholipid antibodies that recognize domain I of beta2-glycoprotein I and a reduction in the anticoagulant activity of annexin A5. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1490–4.

86. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Taatjes DJ. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008 Oct;17(10):922–30.

87. de Laat B, Derksen RHWM, Mackie IJ, Roest M, Schoormans S, Woodhams BJ, et al. Annexin A5 polymorphism (-1C-->T) and the presence of anti-annexin A5 antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2006 Nov;65(11):1468–72.

88. Frostegard AG, Su J, von Landenberg P, Frostegard J. Effects of anti-cardiolipin antibodies and IVIg on annexin A5 binding to endothelial cells: implications for cardiovascular disease. *Scand J Rheumatol*. 2010;39(1).

89. Molina JF, Gutierrez-Urena S, Molina J, Uribe O, Richards S, De Ceulaer C, et al. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1997 Feb;24(2):291–6.

90. Greco TP, Amos MD, Conti-Kelly AM, Naranjo JD, Ijdo JW. Testing for the antiphospholipid syndrome: importance of IgA anti-beta. *Lupus*. 2000;9(1):33–41.

91. Tajima C, Suzuki Y, Mizushima Y, Ichikawa Y. Clinical significance of immunoglobulin A antiphospholipid antibodies: possible association with skin manifestations and small vessel vasculitis. *J Rheumatol*. 1998 Sep;25(9):1730–6.

92. Lee RM, Brown MA, Branch DW, Ward K, Silver RM. Anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein-I antibodies in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2003 Aug;102(2).
93. Selva-O'Callaghan A, Ordi-Ros J, Monegal-Ferran F, Martinez N, Cortes-Hernandez F, Vilardell-Tarres M. IgA anticardiolipin antibodies--relation with other antiphospholipid antibodies and clinical significance. *Thromb Haemost*. 1998 Feb;79(2):282-5.
94. Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Muhlen CA, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2004 Aug;83(2):141-4; 137-40.
95. Staub HL, Franck M, Ranzolin A, Norman GL, Iverson GM, von Muhlen CA. IgA antibodies to beta2-glycoprotein I and atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2006 Dec;6(2):104-6.
96. Yamada H, Tsutsumi A, Ichikawa K, Kato EH, Koike T, Fujimoto S. IgA-class anti-beta2-glycoprotein I in women with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Arthritis Rheum*. 1999 Dec;42(12):2727-8.
97. Danowski A, Kickler TS, Petri M. Anti-beta2-glycoprotein I: prevalence, clinical correlations, and importance of persistent positivity in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2006 Sep;33(9):1775-9.
98. Mehrani T, Petri M. Association of IgA Anti-beta2 glycoprotein I with clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2011 Jan;38(1):64-8.
99. Bertolaccini ML, Atsumi T, Escudero Contreras A, Khamashta MA, Hughes GR. The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2001 Dec;28(12):2637-43.

100. Iverson GM, von Muhlen CA, Staub HL, Lassen AJ, Binder W, Norman GL. Patients with atherosclerotic syndrome, negative in anti-cardiolipin assays, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of beta2-GPI. *J Autoimmun.* 2006 Dec;27(4):266–71.
101. Seif A, Alarcón GS, Aguilar-Valenzuela R, et al. Are IgA anti-b2glycoprotein I clinically relevant? *Lupus.* 2010;19:C 133.
102. Finazzi G, Marchioli R, Brancaccio V, Schinco P, Wisloff F, Musial J, et al. A randomized clinical trial of high-intensity warfarin vs. conventional antithrombotic therapy for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid syndrome (WAPS). *J Thromb Haemost JTH.* 2005 May;3(5):848–53.
103. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2011 Feb;20(2):206–18.
104. Ruiz-Irastorza G, Hunt BJ, Khamashta MA. A systematic review of secondary thromboprophylaxis in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 2007 Dec 15;57(8):1487–95.
105. Pierangeli SS, de Groot PG, Dlott J, Favaloro E, Harris EN, Lakos G, et al. “Criteria” aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus.* 2011 Feb;20(2):182–90.
106. Erkan D, Aguiar CL, Andrade D, Cohen H, Cuadrado MJ, Danowski A, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies: task force report on antiphospholipid syndrome treatment trends. *Autoimmun Rev.* 2014 Jun;13(6):685–96.
107. Samama MM, Guinet C. Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clin Chem*

Lab Med CCLM FESCC. 2011 May;49(5):761–72.

108. Merriman E, Kaplan Z, Butler J, Malan E, Gan E, Tran H. Rivaroxaban and false positive lupus anticoagulant testing. *Thromb Haemost*. 2011 Feb;105(2):385–6.

109. Eerenberg ES, Kamphuisen PW, Sijpkens MK, Meijers JC, Buller HR, Levi M. Reversal of rivaroxaban and dabigatran by prothrombin complex concentrate: a randomized, placebo-controlled, crossover study in healthy subjects. *Circulation*. 2011 Oct 4;124(14):1573–9.

110. Linkins L-A, Dans AL, Moores LK, Bona R, Davidson BL, Schulman S, et al. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012 Feb;141(2 Suppl):e495S – 530S.

111. Johnson R, Charnley J. Hydroxychloroquine in prophylaxis of pulmonary embolism following hip arthroplasty. *Clin Orthop*. 1979 Oct;(144):174–7.

112. Jung H, Bobba R, Su J, Shariati-Sarabi Z, Gladman DD, Urowitz M, et al. The protective effect of antimalarial drugs on thrombovascular events in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010 Mar;62(3):863–8.

113. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Pijoan JI, Garmendia M, Villar I, Martinez-Berriotxoa A, et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006;15(9):577–83.

114. Schmidt-Tanguy A, Voswinkel J, Henrion D, Subra JF, Loufrani L, Rohmer V, et al. Antithrombotic effects of hydroxychloroquine in primary antiphospholipid syndrome patients. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Oct;11(10):1927–9.

115. Erkan D, Derksen WJM, Kaplan V, Sammaritano L, Pierangeli SS, Roubey R, et al. Real world experience with antiphospholipid antibody tests: how stable are results over time? *Ann Rheum Dis*. 2005 Sep;64(9):1321–5.

116. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Ashton AW, Chen PP, Hathcock JJ, et al. Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood*. 2010 Mar 18;115(11):2292–9.
117. Erkan D, Pierangeli SS. Could statins be a new therapeutic option for antiphospholipid syndrome patients? *Expert Rev Hematol*. 2013 Apr;6(2):115–7.
118. Hindler K, Shaw AD, Samuels J, Fulton S, Collard CD, Riedel B. Improved postoperative outcomes associated with preoperative statin therapy. *Anesthesiology*. 2006 Dec;105(6):1260–72; quiz 1289–90.
119. Erre GL, Pardini S, Faedda R, Passiu G. Effect of rituximab on clinical and laboratory features of antiphospholipid syndrome: a case report and a review of literature. *Lupus*. 2008 Jan;17(1):50–5.
120. Kumar D, Roubey RAS. Use of rituximab in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2010 Feb;12(1):40–4.
121. Erkan D, Vega J, Ramon G, Kozora E, Lockshin MD. A pilot open-label phase II trial of rituximab for non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum*. 2013 Feb;65(2):464–71.
122. Stohl W, Hiepe F, Latinis KM, Thomas M, Scheinberg MA, Clarke A, et al. Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement levels, and reduces select B cell populations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012 Jul;64(7):2328–37.
123. Asherson RA, Cervera R, Piette JC, Shoenfeld Y, Espinosa G, Petri MA, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: clues to the pathogenesis from a series of 80 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2001 Nov;80(6):355–77.

124. Cervera R, Espinosa G. Update on the catastrophic antiphospholipid syndrome and the “CAPS Registry”. *Semin Thromb Hemost*. 2012 Jun;38(4):333–8.
125. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1644–54.
126. Lonze BE, Singer AL, Montgomery RA. Eculizumab and renal transplantation in a patient with CAPS. *N Engl J Med*. 2010 May 6;362(18):1744–5.
127. Shapira I, Andrade D, Allen SL, Salmon JE. Brief report: induction of sustained remission in recurrent catastrophic antiphospholipid syndrome via inhibition of terminal complement with eculizumab. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;64(8):2719–23.
128. Ioannou Y, Pericleous C, Giles I, Latchman DS, Isenberg DA, Rahman A. Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human beta(2)-glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43. *Arthritis Rheum*. 2007 Jan;56(1):280–90.
129. Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN. Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum*. 2002 Feb;46(2):545–52.
130. de la Torre YM, Pregnotato F, D’Amelio F, Grossi C, Di Simone N, Pasqualini F, et al. Anti-phospholipid induced murine fetal loss: novel protective effect of a peptide targeting the beta2 glycoprotein I phospholipid-binding site. Implications for human fetal loss. *J Autoimmun*. 2012 May;38(2-3):J209–15.
131. Agmon-Levin N, Blank M, Zandman-Goddard G, Orbach H, Meroni PL, Tincani A, et al. Vitamin D: an instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jan;70(1):145–50.

132. Andreoli L, Piantoni S, Dall'Ara F, Allegri F, Meroni PL, Tincani A. Vitamin D and antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012 Jun;21(7):736–40.
133. Gris JC, Quéré I, Sanmarco M, Boutiere B, Mercier E, Amiral J, et al. Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. The Nîmes Obstetricians and Haematologists Study--NOHA. *Thromb Haemost*. 2000 Aug;84(2):228–36.
134. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009 Jul 21;339:b2700.
135. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999 Jul;42(7):1309–11.
136. Alarcon-Segovia D, Perez-Vazquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1992 Apr;21(5):275–86.
137. Urrutia G, Bonfill X. [PRISMA declaration: a proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses]. *Med Clin (Barc)*. 2010 Oct 9;135(11):507–11.
138. Lakos G, Kiss E, Regeczi N, Tarjan P, Soltesz P, Zeher M, et al. Isotype distribution and clinical relevance of anti-beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) antibodies: importance of IgA isotype. *Clin Exp Immunol*. 1999 Sep;117(3):574–9.
139. Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin A anti-beta2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Sep;185(3):748–53.

140. de Laat B, Pengo V, Pabinger I, Musial J, Voskuyl AE, Bultink IEM, et al. The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Nov;7(11):1767–73.
141. Hunt BJ, Wu X-X, de Laat B, Arslan AA, Stuart-Smith S, Rand JH. Resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with histories for obstetric antiphospholipid syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Nov;205(5):485.e17–23.
142. Andreoli L, Nalli C, Motta M, Norman GL, Shums Z, Encabo S, et al. Anti-beta(2)-glycoprotein I IgG antibodies from 1-year-old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases preferentially target domain 4/5: might it be the reason for their “innocent” profile? *Ann Rheum Dis*. 2011 Feb;70(2):380–3.
143. Wu X-X, Pierangeli SS, Rand JH. Resistance to annexin A5 binding and anticoagulant activity in plasmas from patients with the antiphospholipid syndrome but not with syphilis. *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Jan;4(1):271–3.
144. Rand JH, Wu X-X, Lapinski R, van Heerde WL, Reutelingsperger CP, Chen PP, et al. Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2783–90.
145. Branch DW, Silver R, Pierangeli S, van Leeuwen I, Harris EN. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol*. 1997 Apr;89(4):549–55.
146. Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol*. 1998 Nov;37(11):1229–32.
147. Donohoe S, MacKie IJ, Isenberg D, Machin SJ. Anti-prothrombin antibodies:

assay conditions and clinical associations in the anti-phospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2001 May;113(2):544–9.

148. Munoz-Rodriguez FJ, Reverter JC, Font J, Tassies D, Cervera R, Espinosa G, et al. Prevalence and clinical significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus or with primary antiphospholipid syndrome. *Haematologica*. 2000 Jun;85(6):632–7.

149. Guerin J, Smith O, White B, Sweetman G, Feighery C, Jackson J. Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol*. 1998 Sep;102(4):896–902.

150. Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost*. 1995 Dec;74(6):1597–603.

151. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost*. 2014 Mar;40(2):163–71.

152. Pericleous C, Ruiz-Limon P, Romay-Penabad Z, Marin AC, Garza-Garcia A, Murfitt L, et al. Proof-of-concept study demonstrating the pathogenicity of affinity-purified IgG antibodies directed to domain I of beta2-glycoprotein I in a mouse model of anti-phospholipid antibody-induced thrombosis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2015 Apr;54(4):722–7.

153. Pericleous C, Miles J, Esposito D, Garza-Garcia A, Driscoll PC, Lambrianides A, et al. Evaluating the conformation of recombinant domain I of beta(2)-glycoprotein I and its interaction with human monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 2011 Oct;49(1-2):56–63.

154. Pierangeli SS, Liu X, Espinola R, Olee T, Zhu M, Harris NE, et al. Functional

analyses of patient-derived IgG monoclonal anticardiolipin antibodies using in vivo thrombosis and in vivo microcirculation models. *Thromb Haemost.* 2000 Sep;84(3):388–95.

155. Giles I, Pericleous C, Liu X, Ehsanullah J, Clarke L, Brogan P, et al. Thrombin binding predicts the effects of sequence changes in a human monoclonal antiphospholipid antibody on its in vivo biologic actions. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2009 Apr 15;182(8):4836–43.

156. Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C, Giles I, Papalardo E, Vargas G, et al. In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost JTH.* 2009 May;7(5):833–42.

157. Agostinis C, Durigutto P, Sblattero D, Borghi MO, Grossi C, Guida F, et al. A non-complement-fixing antibody to beta2 glycoprotein I as a novel therapy for antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2014 May 29;123(22):3478–87.

158. Pericleous C, Garza-Garcia A, Murfitt L. Profiling sub-types of anti-beta 2 glycoprotein I and anti-domain I antibodies may distinguish between different clinical phenotypes of the antiphospholipid syndrome (Abstract). *Arthritis Rheum.* 2011;63:S9.

159. Andreoli L, Fredi M, Nalli C, Piantoni S, Reggia R, Dall'Ara F, et al. Clinical significance of IgA anti-cardiolipin and IgA anti-beta2glycoprotein I antibodies. *Curr Rheumatol Rep.* 2013 Jul;15(7):343.

160. Murthy V, Willis R, Romay-Penabad Z, Ruiz-Limon P, Martinez-Martinez LA, Jatwani S, et al. Value of isolated IgA anti-beta2 -glycoprotein I positivity in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2013 Dec;65(12):3186–93.

161. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Taatjes DJ. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus.* 2010 Apr;19(4):460–9.

APÉNDICES

XII. APÉNDICES

1. APÉNDICE 1

Estrategia de búsqueda en pubmed/embase:

www.pubmed.gov/: términos ‘Mesh’ y palabras individuales.

<http://ovidsp.ovid.com/>: Embase: ‘Map to thesaurus’ y ‘explode’ para buscar los términos embase thesaurus.

Se realizó la búsqueda de estas palabras de forma separada como términos “Mesh” y como palabras individuales y después de forma combinada: ([A] OR [B] OR [C]).

- Antiphospholipid antibodies (aPL) (A)
- Antiphospholipid syndrome (SAF) (B)
- Non criteria antibodies (C)
- New assays (D)

Por otra parte, hicimos otra búsqueda independiente de anticuerpos. Buscamos como términos “Mesh” y como palabras individuales y posteriormente en combinación ([E] OR [F] OR [G] OR [H] OR [I] OR [J] OR [K] OR [L] OR [M] OR [N] OR [O] OR [P] OR [Q] OR [R]:

- Anticardiolipin antibodies (aCL) (E).
- Anti β 2 Glycoprotein I antibodies (anti β 2-GPI) (F).
- Lupus anticoagulant (AL) (G).
- Antiphosphatidylserine (aPS) (H).
- Antiphosphatidylethanolamine (aPE) (I).
- Antiphosphatidylinositol (aPI) (J).
- Anti-domain I β 2-glycoprotein I (ADI β 2-GPI) (K).
- IgA anticardiolipin (IgA aCL) (L).

- IgA anti- β 2-glycoprotein I (IgA anti β 2-GPI) (M).
- Antiprothrombin antibodies (aPT) (N).
- Antiphosphatidylcholine (aPC) (O).
- Antivimentin/cardiophilin complex (Vm/CL) (P).
- Antiphosphatidic acid (aPA) (Q).
- Annexin A5 resistance (AnxA5 resistance) (R).

Finalmente obtuvimos una búsqueda por cada grupo independiente y combinamos estos dos grupos con el operador booleano AND.

Los límites utilizados fueron: idioma inglés, ensayos clínicos y humanos.

“Non-criteria” aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010

2. APÉNDICE 2

Hoja de extracción de datos

Número de orden	Título del artículo	Nombre del primer autor	
Fecha de publicación del artículo	Diseño del estudio	Número total de pacientes y de controles	
Diagnóstico	SAF (n)	Controles enfermos(n)	Controles sanos (n)
Número de pacientes			
Edad			
Género			
Raza			
Cumplimiento de los criterios de SAF			
AL (n)			
IgA aCL (n)			
IgM aCL (n)			
IgG aCL (n)			
IgA antiβ2-GPI (n)			
IgM antiβ2-			

GPI (n)

IgG antiβ2-

GPI (n)

AnxA5 R (n)

IgM aDI (n)

IgG aDI (n)

IgA aPE (n)

IgM aPE (n)

IgG aPE (n)

IgM aPA (n)

IgG aPA (n)

IgM aPS (n)

IgG aPS (n)

IgM aPI (n)

IgG aPI (n)

IgM aVm/CL

(n)

IgG aVm/CL

(n)

IgM aPT (n)

IgG aPT (n)

IgM aPS/PT

(n)

IgG aPS/PT
(n)
IgM aPC (n)
IgG aPC (n)
TA (n)
TV (n)
Morbilidad
gestacional (n)

Arriba se adjunta la tabla con las variables utilizadas para la recolección de datos y abajo se realiza una descripción de las mismas.

1. Número de orden: 1º, 2º, 3º ...
2. Título del artículo.
3. Nombre del primer autor.
4. Fecha de publicación del artículo.
5. Diseño del estudio: transversal, caso-control.
6. Diagnóstico:
 - Pacientes con Síndrome Antifosfolípido: síndrome antifosfolípido primario (SAF 1º), síndrome antifosfolípido secundario (SAF 2º), síndrome antifosfolípido con trombosis venosa o arterial (SAF TA/TV), síndrome antifosfolípido con morbilidad gestacional.
 - Controles enfermos: pacientes con lupus (LES+/SAF-), pacientes con síndrome antifosfolípido seronegativos (SNAPS), pacientes con otras enfermedades

autoinmunes (total ARD), pacientes con trombosis arteriales o venosas sin SAF (TA/TV no SAF), pacientes con morbilidad gestacional sin SAF, estenosis carotídea, sífilis, falsos positivos para VDRL, mononucleosis infecciosa, VIH, aterosclerosis, niños con dermatitis atópica, pacientes con anticuerpos positivos pero sin SAF (aPL+/SAF-).

- Controles sanos: niños sanos con un año, controles sanos.
- 7. Número de pacientes en cada estudio: pacientes con SAF, controles enfermos y sanos.
- 8. Edad.
- 9. Género: hombre=0, mujer=1.
- 10. Raza: hispanos, caucásicos, asiáticos, afro-caribeños.
- 11. Cumplimiento de los criterios de clasificación de SAF: no=0, si=1.
- 12. Número absoluto y porcentaje de anticoagulante lúpico (LA).
- 13. Número absoluto y porcentaje de IgA anticardiolipina (aCL).
- 14. Número absoluto y porcentaje de IgM anticardiolipina.
- 15. Número absoluto y porcentaje de IgG anticardiolipina.
- 16. Número absoluto y porcentaje de IgA anti β 2-glucoproteína I (anti β 2-GPI).
- 17. Número absoluto y porcentaje de IgM anti β 2-glucoproteína I.
- 18. Número absoluto y porcentaje de IgG anti β 2-glucoproteína I.
- 19. Número absoluto y porcentaje de resistencia a la Annexina A5 (AnxA5 R).
- 20. Número absoluto y porcentaje de IgM anti Dominio I de la β 2-GPI (aDI).
- 21. Número absoluto y porcentaje de IgG anti Dominio I de la β 2-GPI (aDI).
- 22. Número absoluto y porcentaje de IgA anti-fosfatidiletanolamina (aPE).
- 23. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-fosfatidiletanolamina (aPE).
- 24. Número absoluto y porcentaje de IgG anti-fosfatidiletanolamina (aPE).

25. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-ácido fosfatídico (aPA).
26. Número absoluto y porcentaje de IgG anti-ácido fosfatídico (aPA).
27. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-fosfatidilserina (aPS).
28. Número absoluto y porcentaje de IgG anti-fosfatidilserina (aPS).
29. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-fosfatidilinositol (aPI).
30. Número absoluto y porcentaje de IgG anti-fosfatidilinositol (aPI).
31. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-vimentina/cardioplipina (aVm/CL).
32. Número absoluto y porcentaje de IgG anti-vimentina/cardioplipina (aVm/CL).
33. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-protrombina (aPT).
34. Número absoluto y porcentaje de IgG anti-protrombina (aPT).
35. IgM anti-complejo fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT).
36. Número absoluto y porcentaje de IgG anti- complejo fosfatidilserina/protrombina (aPS/PT).
37. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-fosfatidilcolina (aPC).
38. Número absoluto y porcentaje de IgM anti-fosfatidilcolina (aPC).
39. Número absoluto y porcentaje de trombosis arterial (TA).
40. Número absoluto y porcentaje de trombosis venosa (TV).
41. Número absoluto y porcentaje de pérdidas fetales o morbilidad gestacional.

3. APÉNDICE 3

Artículo original

RHEUMATOLOGY

Rheumatology 2015;54:2042–2050
doi:10.1093/rheumatology/kev226
Advance Access publication 7 July 2015

Original article

Examining the prevalence of non-criteria anti-phospholipid antibodies in patients with anti-phospholipid syndrome: a systematic review

Veronica Rodríguez-García¹, Yiannis Ioannou^{2,3}, Antonio Fernández-Nebro¹, David A. Isenberg² and Ian P. Giles²

Abstract

Objective. To systematically review and establish the prevalence of antibody positivity in assays not currently included in the APS classification criteria to detect antibodies directed against other phospholipids (PLs), PL binding proteins, coagulation factors and a mechanistic test for resistance of Annexin A5 (AnxA5) anticoagulant activity in APS and control populations.

Methods. We searched PubMed and EMBASE using the key words APS, antiphospholipid antibodies, non-criteria, new assays, IgA anticardiolipin antibodies, lupus anticoagulant, anti-Domain I, IgA anti- β 2-glycoprotein I antibodies, antiphosphatidylserine, anti-phosphatidylethanolamine, anti-phosphatidic acid, antiprothrombin, antiphosphatidylserine-prothrombin, anti-vimentin/cardiolipin complex and Annexin A5 resistance. Studies that met inclusion criteria to describe prevalence of non-criteria aPLs in APS patients ($n > 10$), disease and healthy control subjects were systematically examined.

Results. We selected 16 retrospective studies of 1404 APS patients, 1839 disease control and 797 healthy controls. The highest prevalence of non-criteria aPLs in the largest number of patients with APS was found in IgA anti- β 2GPI studies (129/229, 56.3%), AnxA5R (87/163, 53.4%) and IgG anti-Domain I (241/548, 44.0%).

Conclusion. Our finding of a significantly high prevalence of all non-criteria aPLs studied in patients with APS compared with controls was tempered by wide variation in sample size, retrospective collection, assay methodology and different determination of positivity. Therefore, prospective studies of sufficient size and appropriate methodology are required to evaluate the significance of these assays and their utility in the management of patients with APS.

Key words: anti-phospholipid syndrome, anti-phospholipid antibodies, non-criteria, new assays.

CLINICAL SCIENCE

Rheumatology key messages

- The prevalence of all non-criteria aPLs studied was significantly increased in patients with APS compared with controls.
- The most prevalent were IgA anti- β 2GPI, AnxA5R and IgG anti-Domain I in patients with APS.

¹UCG de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica en Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Spain, ²Centre for Rheumatology Research, Division of Medicine, Department of Medicine, Rayne Institute, 5 University Street and ³Arthritis Research UK Centre for Adolescent Rheumatology, University College London, London, UK
Submitted 7 August 2014; revised version accepted 12 May 2015

Correspondence to: Ian P. Giles, Centre for Rheumatology Research, Division of Medicine, Department of Medicine, University College London, Room 411, Rayne Institute, 5 University Street, London WC1E 6JF, UK. E-mail: i.giles@ucl.ac.uk

Introduction

The APS is classified by persistently moderate to high titres of circulating antibodies directed against cardiolipin (aCL), β 2-glycoprotein I (β 2-GPI) and/or those that prolong *in vitro* coagulation (namely LA), which should be positive on at least two occasions 12 weeks apart, in the presence of vascular thrombosis and/or pregnancy morbidity according to consensus criteria [1]. The true diagnostic

Downloaded from <http://rheumatology.oxfordjournals.org/> by guest on January 3, 2017

value of a positive result in only one of these assays is limited by low-quality evidence [2]. Recent evidence indicates that a combination of multiple positivity in these criteria assays provides a more accurate risk profile of patients with more severe disease and risk of recurrence [3, 4].

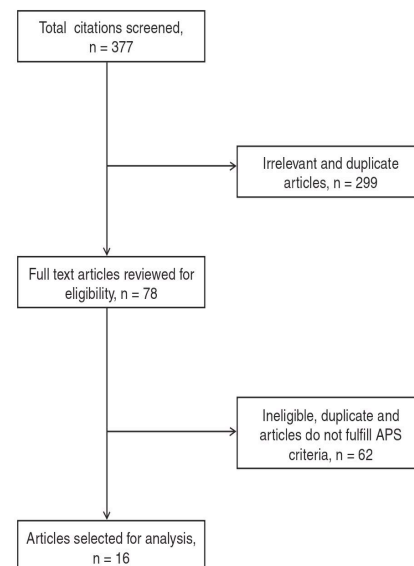
Consequently, increasing interest has focused upon the development of novel assays that may be more specific for APS. These non-criteria assays detect antibodies directed against other phospholipids (PLs), PL binding proteins, coagulation factors and a mechanistic test for resistance of Annexin A5 (AnxA5R) anticoagulant activity. The precise relevance of these non-criteria assays has yet to be established from large multicentre prospective studies. Therefore, we carried out a systematic review to try to establish the prevalence of each non-criteria assay in patients diagnosed with APS and any comparator disease or healthy control (HC) populations.

Materials and methods

Publication search and selection of studies

This review was conducted according to guidelines on preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses [5]. Studies were identified by searching MEDLINE and EMBASE databases up to June 2014 using combinations of the key Medical Subject Headings and free terms: antiphospholipid syndrome (APS), antiphospholipid antibodies (aPL), IgA (aCL), non-criteria antibodies, new assays (IgA anti- β 2-GPI), LA, antiphosphatidylserine (aPS), anti-phosphatidylethanolamine (aPE), anti-phosphatidylinositol (aPI), anti-Domain I β 2-glycoprotein I, antithrombin antibodies (aPT), antiphosphatidylcholine (aPC), antivimentin/cardiophilin complex, antiphosphatidic acid (aPA) and AnxA5R assay. Limits were placed to include the following: English language; clinical trials; and human studies only. Additional studies were identified through checking the reference lists of the non-criteria aPL task force report [6] and other author publications of articles selected for full-text analysis. The full electronic search strategies for MEDLINE and EMBASE databases are shown in the supplementary data, section on Pubmed/Embase Search Strategy, available at *Rheumatology* Online. Two independent reviewers (V.R.-G. and I.P.G.) screened the retrieved articles by reading the title and abstract to identify studies that met inclusion criteria to describe the prevalence of non-criteria aPLs in patients with APS ($n > 10$), disease (autoimmune and/or non-autoimmune thrombotic and/or obstetric) and HCs. Reviews containing no original data and studies containing fewer than 10 patients with APS were excluded. Disagreements were resolved by discussion. Authors were contacted for further information, such as the exact prevalence of some non-criteria antibodies in different groups of patients and control subjects and, if provided, this was included in our analysis. The flow diagram of study selection is shown in Fig. 1.

Fig. 1 Flow diagram of study selection



Data-collection process

A data extraction sheet was developed and its reliability examined on 10 randomly selected studies. It was then refined accordingly to ensure that all relevant data were captured. The final version of the data extraction sheet is shown in supplementary Table S1, available at *Rheumatology* Online. Three authors (V.R.-G., Y.I. and I.P.G.) extracted and independently checked the data. Disagreements were resolved by discussion. Each selected article was systematically examined to note the study characteristics pertaining to the population, intervention, comparison, outcome and time frame.

Patient population

Studies were selected that included the following: patients with APS fulfilling contemporary APS classification criteria [1, 7, 8]; more than 10 patients with APS; measurement of non-criteria aPLs; and whether those patients had experienced arterial or venous thrombosis and/or pregnancy morbidity.

Intervention

Methodology of criteria and non-criteria aPL assays was noted.

Comparison

Data were also collected from patients with SLE (SLE+/APS-), other autoimmune rheumatic diseases, positive aPL and without APS (aPL+/APS-), venous thrombosis without APS, pregnancy morbidity without APS, biologic false-positive syphilis test, syphilis, seronegative APS,

Veronica Rodríguez-García *et al.*

atherosclerosis, stroke, infectious mononucleosis, HIV or carotid artery stenosis, and from HCs.

Outcome

The prevalence of criteria and non-criteria aPLs was noted.

Results

Patient characteristics

Sixteen retrospective studies that fulfilled inclusion criteria were selected, including the following: 1404 patients with (primary or secondary) APS who fulfilled diagnostic criteria; 1839 disease control (DC) subjects, consisting of 68 aPL-positive patients who lacked APS and any other autoimmune disease, 512 with SLE, 382 with atherosclerosis, 34 with syphilis, 203 with other autoimmune rheumatic diseases, 55 seronegative APS patients, 33 children with atopic dermatitis, 328 with pregnancy morbidity, 84 with venous thrombosis but no autoimmune rheumatic diseases, 38 with stroke, 21 with carotid artery stenosis, 21 with VDRL false-positive serology for syphilis, 30 with infectious mononucleosis, 30 with HIV and 797 HCs.

Measurement of non-criteria aPLs

With the exception of AnxA5R and binding, all other non-criteria aPLs were detected by ELISA against single or complexed antigens (in the case of aPS/PT and anti-vimentin/cardioliipin complex). There was, however, appreciable variation in determination of positivity in the measurement of non-criteria aPLs, summarized in Table 1.

The IgA anti- β 2-GPI results were expressed as either optical density (OD) or binding units derived from a positive control and the various cut-offs of positivity were determined from comparison with a varying number of HCs. Lee *et al.* [9] used a commercial assay to detect IgA anti- β 2-GPI, and results were considered positive if values reached ≥ 20 standard IgA anti- β 2-GPI units, which were equivalent to the 98th centile of a large group ($n = 145$) of HCs. Using the same standard, Lakos *et al.* [10] determined a threshold of positivity for anti- β 2-GPI IgG to be 14.6 SGU/ml determined by ELISA as the mean + 3 s.d. of 50 HCs, and IgM/IgA binding was presented as OD and considered positive when above the mean + 3 s.d. of 50 HCs. Iverson *et al.* [11] used an ELISA kit from INOVA Diagnostic to determine IgA anti- β 2-GPI. Assay reproducibility, measured by coefficient of variance (CV), was reported in only one study as intra- (3.2–6.6%) and inter- (3.5–6.6%) assay CV [9].

Likewise, all studies of IgG anti-Domain I utilized varying numbers of HCs. Two multicentre studies [12, 13] considered levels of anti-Domain I as high when the OD was above the mean + 3 s.d. of 30 or 50 normal HCs, while Andreoli *et al.* [14] expressed anti-Domain I positivity above the 95th percentile of 100 HCs. One study reported intra- (12.65%) and inter- (14.82%) assay CV [12].

In contrast, AnxA5R was measured by a two-stage process. In this assay, patient samples are incubated with a PL suspension containing human tissue factor, then

mixed with pooled normal plasma in the presence and absence of AnxA5, which is then recalcified and the resistance to AnxA5 anticoagulant activity calculated. This activity is expressed as the AnxA5 anticoagulant ratio. Three studies demonstrated AnxA5R by comparison with varying numbers of HCs: 30 [13]; 20 [15]; and 10 [16]. One study reported intra- (2–3.8%) and inter- (3.7%) assay CV [16].

AnxA5 binding was measured by spectrofluorometry. Reduced AnxA5 binding was considered when the values were below the mean (s.d.) of 20 HCs [15]. In contrast, Rand *et al.* [16] tested plasma from one HC multiple times, and units were reported as nanograms per well.

IgA aCLs were evaluated using commercial calibrators with predefined cut-offs of positivity [9–11]. Intra- and inter-assay CV were similar at each centre at $< 10\%$.

Binding of IgM, IgG and IgA aPI, aPA, aPE, aPS were expressed as positive when above: 5 s.d. of the mean of an unstated number of HCs [17], 99% of 200 HCs [18] or the 99th percentile of 236 control sera, and the results were expressed as delta OD, that is, the reactivity of each sample without antigen was subtracted from that with antigen [19]. Only one study reported intra- (7%) and inter- (12%) assay CV [19].

Positive IgM and IgG aPT were defined as the mean + 95% centile of 30 HCs [20] or in binding units derived from comparison with a high-binding standard [21] or as the mean (2 s.d.) of a normal control group ($n = 26$) [22] or OD values > 5 s.d. above the mean of negative controls were considered positives (low positive between 5 and 7 s.d., moderate positive 7–9 s.d. and high positive > 9 s.d.) [23]. The intra- and inter-assay CV reported in different studies was, respectively: intra- (IgM 6.2% and IgG 5.2%) and inter- (IgM 8.4% and IgG 8.8%) assay CV [20], intra-assay CV 7.3% and inter-assay CV 8.5% [22] and intra-assay CV IgM/IgG (4.85/4.56) and inter-assay CV IgM/IgG (9.4/13.3) [23]. In contrast, positive values for IgM and IgG aPS/PT were determined to be > 5 s.d. above the mean of 36 HCs [21] with no report of assay CV.

One study that measured antibodies directed against vimentin/cardioliipin complex, determined the cut-off as mean OD + 3 s.d. of 30 HCs [24] and did not report CV.

Overall, these studies used 2, 3 or 5 s.d. or 95th or 99th centile to generate the cut-off for non-criteria aPL positivity. Persistent positivity of the relevant non-criteria aPL was confirmed in only one of the studies [19]. Overall, therefore, only one study fulfils international laboratory criteria for derivation and confirmation of aPL positivity, above the 99th centile of HCs on two or more occasions at least 12 weeks apart [1].

Measurement of criteria aPLs

Likewise, criteria aPLs (IgG/M aCL and IgG/M anti- β 2-GPI) were measured by ELISA with varying definitions of positivity and LA was determined according to the International Society on Thrombosis and Haemostasis criteria [18, 22, 23], summarized in Table 2.

Downloaded from <http://rheumatology.oxfordjournals.org/> by guest on January 3, 2017

TABLE 1 Methodology of non-criteria antibodies

Antibody and authors	Method	Cut-off	Units	Comments
IgA β 2-GPI Lee <i>et al.</i> [9] Lakos <i>et al.</i> [10] Iverson <i>et al.</i> [11]	ELISA	Mean + 95% (30 HCs) [9] 99% (236 HCs) [10]	aPL units [9] OD [10] OD [11]	Three multicentre, cross-sectional studies ($n = 104$ –511) with good intra/inter-assay CV
IgG anti-Domain I De Laat <i>et al.</i> [12] Hunt <i>et al.</i> [13] Andreoli <i>et al.</i> [14]	ELISA	Mean + 3 s.d. (50 HCs) [12] Mean + 3 s.d. (30 HCs) [13] 95th (100 HCs) [14]	OD	One multicentre, one case-control and one cross-sectional study ($n = 154$ –492) in multiple centres with moderate intra/inter-assay CV
AnxA5R Hunt <i>et al.</i> [13] Wu <i>et al.</i> [15] Rand <i>et al.</i> [16]	Modified anticoagulant assay	Mean – 2 s.d. (30 HCs) [13] Mean (2 s.d.) (20 HCs) [15] Mean (2 s.d.) (20 HCs) [16]	AnxA5 anticoagulant ratio	One case-control and two cross-sectional studies ($n = 58$ –166) with single laboratory testing and good intra/inter-assay CV
Annexin A5 binding Wu <i>et al.</i> [15] Rand <i>et al.</i> [16]	Spectro-fluorometry	Mean (s.d.) (20 HCs) [15] Mean (s.d.) (20 HCs) [16]	Nanograms per aliquot [15] Nanograms per well [16]	Studies described above
IgA aCL Lee <i>et al.</i> [9] Lakos <i>et al.</i> [10] Iverson <i>et al.</i> [11]	Single-antigen ELISA	Commercial assay, not stated [9]	aPL units [9] OD [11]	Studies described above
aPI Bertolaccini <i>et al.</i> [17] Branch <i>et al.</i> [18]	Single-antigen ELISA	Mean + 5 s.d. of HCs [17] 99th (200 HCs) [18]	Binding index [17] OD [18]	Two multicentre cross-sectional studies ($n = 82$ –294)
aPA Bertolaccini <i>et al.</i> [17] Branch <i>et al.</i> [18]	Single-antigen ELISA	Mean + 5 s.d. of HCs [17] 99th (200 HCs) [18]	Binding index [17] OD [18]	Studies described above
aPE Bertolaccini <i>et al.</i> [17] Branch <i>et al.</i> [18] Sanmarco <i>et al.</i> [19]	Single-antigen ELISA	Mean + 5 s.d. of HCs [17] 99th (200 HCs) [18] 0.54 IgM/0.1 IgG [19]	Binding index [17] OD [18] Change in OD [19]	One multicentre cross-sectional study ($n = 506$) with moderate intra/inter-assay CV Other studies described above
aPS Bertolaccini <i>et al.</i> [17] Branch <i>et al.</i> [18]	Single-antigen ELISA	Mean + 5 s.d. of HCs [17] 99th (200 HCs) [18]	Binding index [17] OD [18]	Studies described above
aPT Donohoe <i>et al.</i> [20] Atsumi <i>et al.</i> [21] Guerrin <i>et al.</i> [22] Munoz-Rodriguez <i>et al.</i> [23]	Single-antigen ELISA	Mean (2 s.d.) of 30 HCs [20] Mean (2 s.d.) of a normal control group [22] Mean + 5 s.d. of 8 controls [23]	Percentage activity [20] OD [23]	Four cross-sectional studies ($n = 138$ –321) in multiple centres with good intra/inter-assay CV
aPS/PT Atsumi <i>et al.</i> [21]	Single-antigen ELISA	Mean + 5 s.d. (36 HCs)	13 units IgM 2 units IgG	Study described above
Antivimentin/cardioliipin complex Ortona <i>et al.</i> [24]	Single-antigen ELISA	Mean (5 s.d.) (32 HCs)	OD	One single-centre cross-sectional study ($n = 191$)

AnxA5R: annexin A5 resistance; aPA: anti-phosphatidic acid; aPE: anti-phosphatidylethanolamine; aPI: anti-phosphatidylinositol; CV: coefficient of variation; HCs: healthy controls; IgA β 2-GPI: IgA anti- β 2-glycoprotein I; IgG aDI: IgG anti-Domain I; OD: optical density.

Veronica Rodríguez-García *et al.*

TABLE 2 Methodology of criteria antibodies

Antibody and authors	Methods	Cut-off	Units	Comments
LA Lakos <i>et al.</i> [10] Branch <i>et al.</i> [18] Sanmarco <i>et al.</i> [19] Donohoe <i>et al.</i> [20] Atsumi <i>et al.</i> [21]	Diluted Russell's viper venom test Thromboplastin dilution test		APTT	All studies adhered to ISTH criteria Other characteristics are described in Table 1
IgM/G anti- β 2-GPI Lee <i>et al.</i> [9] Lakos <i>et al.</i> [10] De Laat <i>et al.</i> [12] Sanmarco <i>et al.</i> [19] Donohoe <i>et al.</i> [20] Guerin <i>et al.</i> [22] Muñoz-Rodríguez <i>et al.</i> [23]	Single-antigen ELISA	≥ 20 standard units [9] Mean + 3 s.d. (50 HCs) [10] Mean + 10 s.d. (100 HCs) [12] 0.2 IgM/0.1 IgG [19] Mean + 95% of 30 HCs [20] Mean (2 s.d.) (26 HCs) [22] Mean + 5 s.d. (10 HC) [23]	Change in OD [19] 14.6 SGU/ml [10] OD [23]	Variable intra/inter-assay CV Other characteristics are described in Table 1
IgM/G aCL Lee <i>et al.</i> [9] Iverson <i>et al.</i> [11] Branch <i>et al.</i> [18] Sanmarco <i>et al.</i> [19] Donohoe <i>et al.</i> [20]	Single-antigen ELISA	7 and 24 [19] 20 [9, 18, 20]	GPLU, MPLU	Variable CV Other characteristics are described in Table 1

CV: coefficient of variation; GPLU: G phospholipid units; HC: healthy controls; IgM/G anti- β 2-GPI: IgM/G anti- β 2-glycoprotein I; ISTH: International Society of Thrombosis and Haemostasis; MPLU: M phospholipid units; OD: optical density; SGU: standard anti- β 2-GPI units.

Prevalence of non-criteria aPLs

The prevalence of non-criteria aPLs in APS and control groups is summarized in Table 3. For IgA aCL, three (cross-sectional) studies [9–11] found a prevalence of 20.9% in patients with APS ($n=229$), 5.4% in DCs ($n=604$) and 2.8% in HCs ($n=145$). These three studies with similar design and varying sample size were conducted at three different centres [9–11]. These same studies also examined IgA anti- β 2-GPI [9–11] and found a prevalence of 56.3% in patients with APS ($n=229$), 34.4% in DCs ($n=604$) and 13.1% in HCs ($n=145$). Three studies (two cross-sectional and one case-control) of AnxA5R [13, 15, 16] found a prevalence of 53.3% in patients with APS ($n=163$) and 21.2% in DCs ($n=66$), with no HCs studied. The three studies were conducted at three different centres in collaboration with one testing laboratory [6] and were of similar design but differing size [13, 15, 16].

Three studies (one cross-sectional, one case-control and one multicentre) of IgG anti-Domain I found a prevalence of 4% in patients with APS ($n=548$), 31.6% in DCs ($n=234$) and 3.3% in HCs ($n=30$). The three studies were conducted at 11 different centres with different comparator groups: a paediatric study with two groups of children (one with 57 1-year-old healthy children born to mothers with autoimmune diseases and another with 33 children with atopic dermatitis) and one group with 64 patients with APS [14]; a study with three groups, 120 patients with APS (70 of them with pregnancy morbidity and 50 with venous

thrombosis), 16 DCs and 30 HCs [13]; and a study with two groups of different size, 364 APS patients and 128 DCs [12].

Three studies (two cross-sectional and a multicentre case-control) of aPE found a prevalence of 8.0% IgM and 7.7% IgG in patients with APS ($n=337$), 3.4% IgM and 0.5% IgG in DCs ($n=205$) and 2.9% IgM and 1.2% IgG in HCs ($n=340$). These three studies were conducted with differing design and size at 11 different centres [17–19].

Two cross-sectional studies of similar design and differing total sample size [17, 18] reported the prevalence of aPA, aPS and aPI. For aPA, the prevalence was 25.0% IgM and 68.6% IgG in patients with APS ($n=67$), 2.9% IgM and 0.9% IgG in DCs ($n=205$) and 0% IgM and 0% IgG in HCs ($n=104$). The prevalence of aPS was 31.3% IgM and 59.7% IgG in patients with APS ($n=67$), 2.9% IgM and IgG in DCs (205) and 0.9% IgM and 0% IgG in HCs ($n=104$). For aPI, the prevalence was 25.4% IgM and 31.3% IgG in patients with APS ($n=67$), 2.9% IgM and 0.9% IgG in DCs ($n=205$) and 0% IgM and IgG in HCs ($n=104$).

Four cross-sectional studies of differing total sample size [20–23] found a prevalence of aPT of 35.6% IgM and 32.8% IgG in ($n=180$ and $n=207$) patients with APS, 10.1% IgM and 30.6% IgG in ($n=366$ and $n=634$) DCs and 1.7% IgM and 2.56 IgG in HCs ($n=117$).

One cross-sectional study of aPS/PT [21], which lacked HCs found a prevalence of 20.4% IgM and 43.2% IgG in



TABLE 3 Prevalence of non-criteria antibodies

	APS		Disease controls		Healthy controls		P-value ^a	P-value ^b
	No. positive/total (% positive)		No. positive/total (% positive)		No. positive/total (% positive)			
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
Anti-Domain I	NR	241/548 (4)	NR	74/234 (31.6)	NR	1/30 (3.3)	NR	<0.001 ^b
aPE	27/337 (8)	26/337 (7.7)	7/205 (3.4)	1/205 (0.5)	10/340 (2.9)	4/340 (1.2)	0.005 ^b	<0.001 ^b
aPT	64/180 (35.6)	68/207 (32.8)	37/366 (10.1)	194/634 (30.6)	2/117 (1.7)	3/117 (2.6)	<0.001 ^c	0.004 ^c
aPA	19/76 (25.0)	46/67 (68.6)	6/205 (2.9)	2/205 (0.9)	0/104 (0)	0/104 (0)	<0.001 ^c	<0.001 ^c
aPS	21/67 (31.3)	40/67 (59.7)	6/205 (2.9)	6/205 (2.9)	1/104 (0.9)	0/104 (0)	<0.001 ^c	<0.001 ^c
aPI	17/67 (25.4)	21/67 (31.3)	6/205 (2.9)	2/205 (0.9)	0/104 (0)	0/104 (0)	<0.001 ^c	<0.001 ^c
aPS/PT	9/44 (20.4)	19/44 (43.2)	4/217 (1.8)	10/217 (4.6)	0/0 (0)	0/0 (0)	<0.001	<0.001
Anti-vimentin/cardioli- pin complex	32/40 (80)	37/40 (92.5)	29/119 (24.3)	36/119 (30.2)	0/32 (0)	0/32 (0)	<0.001 ^c	<0.001 ^c
IgA aCL	48/229 (20.9)	NR	33/604 (5.4)	NR	4/145 (2.8)	NR	<0.001 ^b	NR
IgA β2-GPI	129/229 (56.3)	NR	208/604 (34.4)	NR	19/145 (13.1)	NR	<0.001 ^b	NR
AnxA5R	87/163 (53.3)	NR	14/66 (21.2)	NR	0/91 (0)	NR	<0.001 ^c	NR

^aP-values refer to APS vs HC and DC. ^bChi-square. ^cFisher's exact test. aPA: anti-phosphatidic acid; aPE: anti-phosphatidylethanolamine; aPI: anti-phosphatidylinositol; AnxA5R: Annexin A5 resistance; IgA β 2-GPI: IgA anti- β 2-glycoprotein I; IgA aCL: IgA anti-Domain I; NR: not reported.

patients with APS ($n=44$) and 1.8% IgM and 4.6% IgG in DCs ($n=217$). A cross-sectional study of anti-vimentin/cardioli-
pin complex [24] found a prevalence of 80.0% IgM and 92.5% IgG in patients with APS ($n=40$), 24.3% IgM and 30.2% IgG in DCs ($n=119$) and 0% IgM/G in HCs ($n=32$).

Prevalence of criteria aPLs

The prevalence of IgM/G aCL from five studies (one case-control and four cross-sectional), IgM/G anti- β 2GPI from four studies (one case-control and three cross-sectional) and LA from two cross-sectional studies is shown in Table 4.

Discussion

In this systematic review, we have identified a high prevalence of non-criteria aPLs in patients with APS compared with various DCs and HCs. The highest prevalence of non-criteria aPLs in the highest number of patients with APS from multiple studies was found in studies of IgA anti- β 2-GPI (129/229, 56.3%), AnxA5R (87/163, 53.3%) and IgG anti-Domain I (241/548, 43.9%). All non-criteria aPLs studied, however, were found to be significantly raised in APS compared with DCs and HCs.

Most of the individual studies were of relatively small sample size, and only six of the non-criteria assays were studied in cohorts of more than 100 patients: anti-Domain I, $n=548$; aPE, $n=337$; IgA aCL, $n=229$; IgA anti- β 2-GPI, $n=229$; aPT, $n=207$; and AnxA5R, $n=163$. The remaining assays were tested in smaller ($n \leq 100$) cohorts: aPA, $n=76$; aPI, $n=67$; aPS, $n=67$; aPS/PT, $n=44$; and anti-vimentin/cardioli-
pin complex, $n=40$. Overall, the highest prevalence of non-criteria aPLs was found for IgG (37/40, 92.5%) and IgM (32/40, 80.0%) anti-vimentin/cardioli-
pin complex in a single centre study; IgG aPA (46/47, 68.6%) in two studies from five different centres; IgG aPS (40/67, 59.7%) in two studies from five centres; and IgG aPS/PT (19/44, 43.2%). However, the smaller sample sizes and numbers of centres involved in these studies makes the significance of these higher titre non-criteria aPL findings less certain.

Despite most assays being ELISA based, we found a wide variation in the methodology used to derive a positive cut-off level for each non-criteria aPL. In particular, the number of HCs from whom a reference range was derived ranged from one (repeatedly tested) to 236 control samples, with the majority of studies using 20–50 controls. Furthermore, studies used 2, 3 or 5 s.d. or the 95th or 99th centile to generate the cut-off for positivity, and persistent positivity of non-criteria aPLs was confirmed in only one study [19]. Therefore, only one study fulfils international



TABLE 4 Prevalence of criteria antibodies

	APS		Disease controls		Healthy controls		P-value ^a IgM	P-value ^a IgG
	No. positive/total (% positive)		No. positive/total (% positive)		No. positive/total (% positive)			
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG		
aCL	49/545 (8.9)	213/545 (39.0)	25/634 (3.9)	49/634 (7.7)	10/383 (2.6)	22/383 (5.7)	<0.0001 ^b	<0.0001 ^b
Anti-β2-GPI	94/440 (21.3)	102/440 (23.1)	51/329 (15.5)	28/329 (8.5)	9/381 (2.3)	5/381 (1.3)	<0.0001 ^b	<0.0001 ^b
LA	67/340 (19.7)		33/107 (30.8)		5/236 (2.1)		<0.0001 ^b	

^aP-values refer to APS vs HC and DC. ^bChi-square. Anti-β₂-GPI: anti-β₂-glycoprotein I.

laboratory criteria for derivation and confirmation of aPL positivity [1]. In addition, there was wide variation in the type of DC groups used and a relative lack of non-autoimmune thrombotic or obstetric controls in comparison with autoimmune disease. Only 5 of 16 studies had both autoimmune and non-autoimmune DCs in addition to HCs.

Overall, 12 of 16 studies contained patients who satisfied the original or revised APS classification criteria. The reason for the inclusion of four studies with patients who did not satisfy APS classification criteria [17, 10, 18, 22] was because they were conceived and executed before the publication of the original criteria in 1999 [7]. Notably, only two of these studies clearly checked for persistent positivity of criteria aPLs using a 99th centile (i.e. above 2.58 s.d.) cut-off for positivity [17, 18]. Later studies that did not meet APS classification criteria were excluded from our analysis.

Other considerations of the relevance of these findings include the following: assay reliability (CV) within each centre; reproducibility by other independent groups; and study design. CV was reported (in 6/16, 37.5% of studies) and displayed <10% (*n*=4) or 10–15% (*n*=2) intra/inter-assay CV, confirming relatively good reliability in fewer than half of the studies. Findings from the majority (11/16, 68.7%) of the non-criteria assays were reproduced by multiple independent groups, with the exception of assays of AnxA5R, anti-vimentin/cardioliipin complex and aPS/PT, which were all performed in a single centre, although the aPS/PT assay has been widely used in studies of the pathogenesis of APS. There were differences in study design, and only 4/16 (25.0%) of the studies that we selected were primarily designed to identify the prevalence of these non-criteria aPLs.

The frequency and strength of positive association between criteria aPLs and clinical manifestations varies between clinical studies, and no one criteria aPL has emerged as the leading predictor of thrombotic or obstetric APS manifestations. Unfortunately, we were unable to examine whether any of the non-criteria aPLs were more frequent in particular APS features because none of the studies gave an appropriate breakdown of this information

and they reported only overall prevalence figures for APS as a whole.

We do not believe that we have missed many important papers, particularly on IgA aCL, because our primary study question was to identify the prevalence of non-criteria aPLs in APS patients and then compare it with any control populations from the identified studies. Therefore, our PICO (patient population, intervention, comparison, outcome), required patients to fulfil contemporary APS classification criteria, so we deliberately excluded many papers studying the prevalence of non-criteria aPLs in other disease, particularly SLE, populations. Therefore, many IgA aCL studies that were carried out in patients with SLE who lacked APS were specifically excluded. Indeed, we were surprised at how few of the well-known non-criteria aPL papers did report on the prevalence of these antibodies in patients with APS.

The high prevalence of IgG anti-Domain I, IgA anti-β₂-GPI and AnxA5R in the largest studies is interesting because these non-criteria aPLs have all been strongly implicated in the pathogenesis of APS. We have shown that both affinity-purified IgG anti-Domain I from APS serum [25] and a human monoclonal IgG aPL that binds Domain I [26] are prothrombotic *in vivo* [27, 28]. In the same mouse model, we have shown that recombinant human Domain I abrogates aPL-induced thrombosis [29]. Independently, using a different *in vivo* model, a human monoclonal IgG anti-Domain I has been shown to be prothrombotic and cause fetal loss in mice treated with lipopolysaccharide [30]. Notably, a number of different assays using different sources of Domain I have been reported. The studies by De Laat *et al.* [12, 31] that met our inclusion criteria used an assay dependent on comparison of binding to Domain I on hydrophobic and hydrophilic plates. In contrast, we have developed a simple solid-phase anti-Domain I assay for testing in patient serum but have published data only in abstract form [32], which was not suitable for inclusion in this systematic analysis.

Interestingly, isolated IgA anti-β₂-GPI positivity (in patients negative for IgG/IgM aCL/aβ₂-GPI and LA) has been shown to be associated with both venous thrombosis and pregnancy morbidity [33], and purified IgA



anti- β 2-GPI is prothrombotic *in vivo* [34]. We have compared IgG, IgM and IgA aCL, anti- β 2-GPI and anti-Domain I in a large cohort of patients with APS ($n=11$) and HCs ($n=200$) (our unpublished data). We found that IgA aCLs are comparable to, and IgA anti- β 2-GPI better than, their IgM counterparts in predicting APS in this study population. We also found that anti-Domain I of all three isotypes is associated with APS with high specificity.

AnxA5R binds PL bilayers in cell membranes, forming an anticoagulant shield that prevents PL from interacting with coagulation enzymes, and aPLs disrupt this shield to expose PL and thereby accelerate blood coagulation reactions [35]. This aPL-mediated interaction is reversed by HCQ, which inhibits the formation of aPL IgG- β 2-GPI complexes, and by promoting the formation of a second layer of AnxA5 crystal patches over areas where the immune complexes had disrupted AnxA5 crystallization [36]. Interestingly, AnxA5R has been correlated with aPLs that recognize an epitope on Domain I of β 2-GPI [6].

In conclusion, we have identified a significantly high prevalence of various non-criteria aPLs in patients with APS compared with controls. However, this finding is tempered by a wide variation in sample size and assay methodology. Assays to detect IgA anti- β 2-GPI, AnxA5R and IgG anti-Domain I are of particular interest given the work that has identified their potential importance in the pathogenesis of APS. Further prospective studies of sufficient size and appropriate methodology examining non-criteria aPLs in APS and controls are now required to evaluate the true utility of these antibodies in management of patients with APS and whether they are likely to replace or be added to the current panel of criteria aPL laboratory assays.

Acknowledgements

Y.I. is supported through an Arthritis Research UK Grant (ref: 20164) and is also supported by the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centres. This work was partly supported by an Arthritis Research UK Programme Grant (ref: 19423) and undertaken at University College London Hospital/University College London, who received a proportion of funding from the Department of Health's National Institute for Health Research Biomedical Research Centres funding scheme. V.R.-G. was funded by an FER grant from The Spanish Society of Rheumatology.

Funding: No specific funding was received from any funding bodies in the public, commercial or not-for-profit sectors to carry out the work described in this manuscript.

Disclosure statement: V.R.-G. is funded by an FER (Spanish Society of Rheumatology) grant. All other authors have declared no conflicts of interest.

Supplementary data

Supplementary data are available at *Rheumatology* Online.

References

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
- Garcia D, Akl EA, Carr R, Kearon C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review. *Blood* 2013;122:817-24.
- Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C *et al.* Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005;93:1147-52.
- Tincani A, Andreoli L, Casu C, Cattaneo R, Meroni P. Antiphospholipid antibody profile: implications for the evaluation and management of patients. *Lupus* 2010;19:432-5.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J *et al.* The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ* 2009;339:b2700.
- Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T *et al.* "Non-criteria" aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011;20:191-205.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-11.
- Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1992;21:275-86.
- Lee RM, Branch DW, Silver RM. Immunoglobulin A anti- β 2-glycoprotein antibodies in women who experience unexplained recurrent spontaneous abortion and unexplained fetal death. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:748-53.
- Lakos G, Kiss E, Regéczy N *et al.* Isotype distribution and clinical relevance of anti- β 2-glycoprotein I (β 2-GPI) antibodies: importance of IgA isotype. *Clin Exp Immunol* 1999;117:574-9.
- Iverson GM, von Mühlen CA, Staub HL *et al.* Patients with atherosclerotic syndrome, negative in anti-cardiolipin assays, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of β 2-GPI. *J Autoimmun* 2006;27:266-71.
- De Laat B, Pengo V, Pabinger I *et al.* The association between circulating antibodies against domain I of beta2-glycoprotein I and thrombosis: an international multicenter study. *J Thromb Haemost* 2009;7:1767-73.
- Hunt BJ, Wu X-X, de Laat B *et al.* Resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with histories for obstetric antiphospholipid syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:485.e17-23.
- Andreoli L, Nalli C, Motta M *et al.* Anti- β 2-glycoprotein I IgG antibodies from 1-year-old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases preferentially target domain 4/5: might it be the reason for their 'innocent' profile? *Ann Rheum Dis* 2011;70:380-3.



Veronica Rodríguez-García *et al.*

- 15 Wu X-X, Pierangeli SS, Rand JH. Resistance to annexin A5 binding and anticoagulant activity in plasmas from patients with the antiphospholipid syndrome but not with syphilis. *J Thromb Haemost* 2006;4:271-3.
- 16 Rand JH, Wu X-X, Lapinski R *et al.* Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2004;104:2783-90.
- 17 Bertolaccini ML, Roch B, Amengual O *et al.* Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 1998;37:1229-32.
- 18 Branch DW, Silver R, Pierangeli S, van Leeuwen I, Harris EN. Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol* 1997;89:549-55.
- 19 Sanmarco M, Gayet S, Alessi M-C *et al.* Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis. A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2007;97:949-54.
- 20 Donohoe S, MacKie IJ, Isenberg D, Machin SJ. Anti-prothrombin antibodies: assay conditions and clinical associations in the anti-phospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2001;113:544-9.
- 21 Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML *et al.* Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000;43:1982-93.
- 22 Guerin J, Smith O, White B *et al.* Antibodies to prothrombin in antiphospholipid syndrome and inflammatory disorders. *Br J Haematol* 1998;102:896-902.
- 23 Muñoz-Rodríguez FJ, Reverter JC, Font J *et al.* Prevalence and clinical significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus or with primary antiphospholipid syndrome. *Haematologica* 2000;85:632-7.
- 24 Ortona E, Capozzi A, Colasanti T *et al.* Vimentin/cardioliipin complex as a new antigenic target of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010;116:2960-7.
- 25 Pericleous C, Ruiz-Limón P, Romay-Penabad Z. Affinity-purified antibodies directed to domain I of beta 2GPI are pathogenic in a mouse model of thrombosis. *Rheumatology* 2013;52 (Suppl 1): i131 (Abstract 199).
- 26 Pericleous C, Miles J, Esposito D *et al.* Evaluating the conformation of recombinant domain I of β_2 -glycoprotein I and its interaction with human monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2011;49:56-63.
- 27 Pierangeli SS, Liu X, Espinola R *et al.* Functional analyses of patient-derived IgG monoclonal anticardiolipin antibodies using in vivo thrombosis and in vivo microcirculation models. *Thromb Haemost* 2000;84:388-95.
- 28 Giles I, Pericleous C, Liu X *et al.* Thrombin binding predicts the effects of sequence changes in a human monoclonal antiphospholipid antibody on its in vivo biologic actions. *J Immunol* 2009;182:4836-43.
- 29 Ioannou Y, Romay-Penabad Z, Pericleous C *et al.* In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of β_2 -glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost* 2009;7:833-42.
- 30 Agostinis C, Durigutto P, Sblattero D *et al.* A non-complement-fixing antibody to β_2 glycoprotein I as a novel therapy for antiphospholipid syndrome. *Blood* 2014;123:3478-87.
- 31 De Laat B, Derksen RHWM, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β_2 -glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2005;105:1540-5.
- 32 Pericleous C, Garza-Garcia A, Murfitt L. Profiling sub-types of anti-beta 2 glycoprotein I and anti-domain I antibodies may distinguish between different clinical phenotypes of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2011;63:S9.
- 33 Andreoli L, Fredi M, Nalli C *et al.* Clinical significance of IgA anti-cardiolipin and IgA anti- β_2 glycoprotein I antibodies. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:343.
- 34 Murthy V, Willis R, Romay-Penabad Z *et al.* Value of isolated IgA anti- β_2 -glycoprotein I positivity in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2013;65:3186-93.
- 35 Rand JH, Wu X-X, Quinn AS, Taatjes DJ. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis. *Lupus* 2010;19:460-9.
- 36 Rand JH, Wu X-X, Quinn AS *et al.* Hydroxychloroquine protects the annexin A5 anticoagulant shield from disruption by antiphospholipid antibodies: evidence for a novel effect for an old antimalarial drug. *Blood* 2010;115:2292-9.

Downloaded from <http://rheumatology.oxfordjournals.org/> by guest on January 3, 2017